



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Circovirus porcina en Colombia: Aspectos moleculares y caracterización biológica de cepas de campo

María Antonia Rincón Monroy

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Doctorado en Salud y Producción Animal
Bogotá, D.C.
2014

Circovirus porcina en Colombia: Aspectos moleculares y caracterización biológica de cepas de campo

María Antonia Rincón Monroy
Código: 787028

**Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial
para optar al título de: Doctorado en Ciencias de la Salud Animal**

Director:

José Darío Mogollón Galvis, M.Sc. Ph.D.

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Doctorado en Salud y Producción Animal
Bogotá, D.C.
2014**

Agradecimientos

A Dios, infinitas gracias.

A mi familia por su apoyo incondicional y comprensión

Al Dr. José Darío Mogollón por su motivación, apoyo y amistad.

A los profesores y compañeros del grupo de Microbiológica y Epidemiología Veterinaria.

Al Instituto Colombiano Agropecuario por la oportunidad de capacitación y a los compañeros de porcinos y molecular del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del ICA.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a ASOPORCICULTORES por el apoyo financiero.

Declaratoria de originalidad y reconocimiento

El autor manifiesta que el presente documento es original y se realizó sin violar, transgredir y/o usurpar derechos de autor de terceros; por lo tanto es de su exclusiva autoría y detenta su titularidad sobre la misma.

Resumen

Circovirus porcino en Colombia: Aspectos moleculares y caracterización biológica de cepas de campo

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2), considerado como el agente etiológico del Síndrome Multisistémico de Emaciación Post-destete ocasiona severos problemas económicos en la industria porcina mundial. En este estudio se investigó la presencia del PCV2 en cerdos sanos y con signos clínicos de PMWS en muestras colectadas durante el periodo 2002 – 2009. El ADN viral se detectó en casos asociados con PMWS y en cerdos con infección persistente. Se analizaron 23 secuencias del ORF2 viral correspondiente a cepas de campo los cuales se clasificaron dentro de los genotipos PCV2a y PCV2b. Se obtuvieron dos aislamientos virales a partir de muestras colectadas en granjas de diferentes regiones geográficas, el análisis filogenético de las cepas permitió clasificarlas como PCV2b. En la infección experimental de lechones privados de calostro con una cepa aislada de un porcino con PMWS no se observaron signos clínicos pero la infección fue confirmada mediante el análisis por IHQ, PCR y seroconversión. Se estudió la dinámica de la infección viral por el PCV2 en 40 cerdas de reemplazo sanas de granjas comerciales y multiplicadoras mediante el análisis de muestras de sangre e hisopos nasales y vaginales, colectadas al ingreso de los animales, en la aclimatización, al parto y un día post-parto así como en calostro colectado inmediatamente después del parto. Al momento del ingreso, las cerdas sanas mostraron alta carga viral en suero y excreción viral a través de fluidos nasales y vaginales mostrando la introducción de animales infectados a las granjas. Adicionalmente la mayoría de las cerdas eran virémicas y eliminaban el virus al momento del parto. En los lechones neonatos aparentemente sanos se detectó viremia, desarrollo de anticuerpos seroneutralizantes anti-PCV2 y presencia del ADN en tejidos confirmando la transmisión vertical de la infección por el PCV2. Los genotipos PCV2a y PCV2b fueron detectados en los lechones con infección *in útero*.

Palabras claves: Circovirus porcino tipo 2, Síndrome Multisistémico de Emaciación Post-destete, caracterización genética, infección experimental, cerdas de reemplazo

Abstract

Porcine circovirus diseases in Colombia: Molecular aspects and biological characterization of field strains

Porcine circovirus type 2 (PCV2), the causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), is a serious economic problem for the swine industry in the world. In this study, we investigated the presence of PCV2 in piglets affected with PMWS and also in healthy pigs within a period time from 2002 -2009. PCV2 DNA was detected in cases associated with PMWS but also in healthy pigs with a persistent infection. The ORF2 nucleotide sequences of 23 PCV2 strains were divided into two groups: PCV2a and PCV2b. Two field viral isolates from herds located in different regions were obtained and the sequence analysis showed that these strains belonged to genotype PCV2b. Five, colostrum-deprived piglets from a conventional farm were inoculated IN and IM with PCV2, originally isolated from a naturally affected pig with PMWS. All the infected animals appeared clinically normal but PCV2 infection was confirmed by IHQ, PCR and seroconversion. To assess the infection dynamics of PCV2 and serum antibody response in gilts from breeding farms subclinically affected by PMWS and their litter, blood samples, nasal and vaginal swabs were collected from forty gilts at arrival, acclimatization, farrowing and one day after the farrowing. Colostrum samples were collected immediately after parturition. A high level of viremia and a high viral load of PCV2 in nasal and vaginal swabs were detected in healthy gilts at the arriving showing the introduction of infected animals into those farms. In addition, most of the gilts were positive for PCV2 DNA in serum, nasal and vaginal swabs at farrowing. Dam's infection resulted in detectable viremia, development of anti-PCV2 antibodies, and the presence of PCV2 DNA in tissue samples of live-born normal appearing piglets confirming the potential of vertical transmission of PCV2 infection. PCV2a and PCV2b genotypes were detected in that *In utero* PCV2 infection.

Keywords: Porcine circovirus type 2; Post-weaning multi-systemic wasting; Genetic characterization, experimental infection, gilts

Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract	VIII
Lista de Figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Anexos	XVII
Objetivos	1
Objetivo general	1
Objetivo específico	1
1. Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)	3
1.1 Historia y enfermedades asociadas al circovirus porcino	3
1.2 Origen y taxonomía	6
1.3 Morfología y organización molecular	7
1.4 Transcripción y replicación	10
1.5 Clasificación genética	12
1.6 Diferencias moleculares y patogenicidad	16
1.7 Epítomos de anticuerpos y diferencias antigénicas	18
1. 8 Propiedades biológicas y fisicoquímicas	19
1. 9 Infecciones asociadas al PCV2	19
1.10 Signos clínicos y lesiones	19
1.11 Transmisión	21
1.12 Patogénesis	23
1.13 Diagnóstico	26
1.14 Caracterización genotípica del PCV2	27
1.15 PCV2 e infecciones reproductivas	29
1.16 Infección de las cerdas	29

1.17	Infección en fetos y lechones	30
1.18	Inmunidad protectora frente al PCV2	31
	Referencias	34
2.	Detección y caracterización molecular del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en porcinos con el síndrome multisistémico de emaciación post-destete de Colombia	61
	Abstract	61
	Introducción	62
2.1	Materiales y métodos	63
2.1.2	Extracción del ADN y detección por PCR del PCV2	66
2.1.3	Amplificación por PCR del gen ORF2	67
2.1.4	Secuencias virales y análisis filogenético	68
2.2.	Resultados	69
2.2.1	Detección del ADN viral para el PCV2	69
2.2.2	Especificidad y sensibilidad de la PCR convencional	71
2.2.3	Caracterización genética	71
2.2.4	Análisis filogenético	72
2.3	Discusión	74
2.4	Conclusiones	78
2.5	Recomendaciones	79
	Referencias	82
	Anexos	91
3.	Caracterización molecular y biológica de aislamientos de campo del PCV2 en lechones privados de calostro	97
	Abstract	97
	Introducción	98
3.1	Materiales y métodos	100
3.1.1	Colección de las muestras	100
3.1.2	Aislamiento viral	100
3.1.3	Técnica de Inmunoperoxidasa en Monocapa	101
3.1.4	PCR para la detección del PCV1	102

3.1.5	PCR para la detección del PCV2	103
3.1.6	Análisis de las secuencias	104
3.1.7	Reproducción experimental de la infección	105
3.1.7.1	Análisis serológico	107
3.1.7.2	Análisis histopatológico	107
3.1.7.3	Análisis Inmunohistoquímico	109
3.1.7.4	PCR para la detección del PCV1 y PCV2	110
3.2	Resultados	110
3.2.1	Aislamiento del PCV2	110
3.2.2.	Detección por PCR del PCV1 y PCV2	111
3.2.3	Clasificación filogenética de los aislamientos PCV2	112
3.2.4	Reproducción experimental de la infección	113
3.2.4.1	Observaciones clínicas y lesiones macroscópicas a la necropsia	113
3.2.4.2	Lesiones histopatológicas	114
3.2.4.3	Detección del PCV2 por PCR	115
3.2.4.3	Evaluación serológica	116
3.3	Discusión	117
3.4	Conclusiones y recomendaciones	122
	Referencias	123
	Anexos	133
4.	Dinamica de la infeccion y respuesta de anticuerpos en cerdasde reemplazo subclínicamente infectadas por el circovirus porcino tipo 2 y efecto en su progenie	147
	Abstract	147
	Introducción	148
4.1	Materiales y métodos	149
4.1.1	Selección de las granjas	149
4.1.2	Colección de las muestras	150
4.1.3	Serología	151

4.1.4	Detección y cuantificación de la carga viral y diferenciación delos genotipos PCV2a/PCV2b	152
4.1.4.1	Extracción del ADN	152
4.1.4.2	Diseño de los cebadores para la prueba cuantitativa SYBR Green	153
4.1.4.3	Análisis estadístico	154
4.2	Resultados	154
4.2.1	Especificidad de los cebadores	154
4.2.2	Optimización y especificad de la PCR tiempo real	155
4.2.3	Optimización de la prueba PCR tiempo real SYBR GREEN	155
4.2.4	Anticuerpos neutralizantes en las cerdas	157
4.2.5	Anticuerpos neutralizantes en los lechones neonatos	158
4.2.6	Carga viral en las cerdas	159
4.2.7	Carga viral en lechones neonatos	160
4.2.8	Clasificación genotípica de las muestras ADN PCV2 positivas	161
4.3	Discusión	162
4.4	Conclusiones	170
4.5	Recomendaciones	171
	Referencias	173
	Anexos	181
	5. Comentarios finales	189
	6. Propuesta de estudios futuros	192

Lista de figuras

	Pág.
1. Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)	
Figura 1. Clasificación taxonómica de PCV2 (www.ictvdb.org)	8
2. Detección y caracterización molecular del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en porcinos con el síndrome multisistémico de emaciación post-destete de Colombia	
Figura 1. Detección del PCV2 en muestras de suero por la técnica PCR convencional.	69
Figura2. Árbol filogenético construido por el método de neighbor-joining basado en la secuencia de 702 nucleótidos del ORF2 PCV2.	74
Figura 3.Alineamiento predictivo de las secuencias de aminoácidos Del ORF2 de las 23 cepas PCV2 analizadas.Los cambios a nivel de aminoácidos se localizaron entre las posiciones 57-89,121 – 134 y 190-210 (líneas superiores oscuras).	80
3. Caracterización molecular y biológica de aislamientos de campo Del PCV2 en lechones privados de calostro	
Figura1. Reproducción experimental de la infección por PCV2 en lechones comerciales privados de calostro.	107
Figura 2.Detección del PCV2 por inmunohistoquímica en células PK15 (La flecha blanca indica células infectadas con el aislamiento C03739).400x	111
Figura 3.Detección del PCV2 por PCR convencional	112

Figura 4. Análisis filogenético de dos aislamientos colombianos de PCV2 de los departamentos del Valle y Antioquia y otras secuencias reportadas en el Gen Bank, basadas en la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de la cápside.	112
Figura 5. Tinción hematoxilina-eosina de una sección de ganglio linfático inguinal del lechón No.1 en el grupo infectado por el virus PCV2 CO3709 a los 30 dpi. 400X	114
Figura 6. Microfotografía ganglio linfático. Identificación del antígeno viral en el citoplasma de los macrófagos (color rojo) por medio de la prueba de IHQ. Lesión moderada 2. 400X	115
4. Dinámica de la infección y respuesta de anticuerpos en cerdas de reemplazo subclínicamente infectadas por el circovirus porcino tipo 2 y efecto en su progenie	
Figura 1. Curva estándar (número de copia vs ciclo umbral (Ct) para diluciones del plásmido y muestras de campo en la prueba SYBR Green correspondientes a tres pozos con 20 µl de reacción total.	156
Figura 2. Señales fluorescentes durante la reacción SYBR Green para cada serie de dilución de plásmido de ADN (118pb fragmento; 5.45×10^{-11} a 5.45×10^{-3} copias /µl).	156
Figura 3. Comparación de las curvas de fusión de los productos PCR SYBR Green para los genotipos PCV2a, PCV2b mostrando una diferencia 1,99°C entre ambos genotipos.	157
Figura 4. Comparación de los promedios en los títulos de anticuerpos neutralizantes (VNT50) en las cerdas.	158
Figura 5. Número de muestras por genotipo del PCV2 en las cerdas de acuerdo con los valores Tm del producto de la PCR SYBR Green. A=Ingreso, C = climatización, P = Parto, PP= Post-parto.	162

Lista de tablas

Pág.

1. Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)

Tabla 1. Nomenclatura publicada para los principales genotipos de PCV2 13

Tabla 2. Secuencias prototipos para los genotipos del PCV2 13

2. Detección y caracterización molecular del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en porcinos con el síndrome multisistémico de emaciación post-destete de Colombia

Tabla 1. Características de las granjas y porcinos analizados en el Estudio retrospectivo 64

Tabla 2. Características de las granjas y porcinos estudiados en las muestras colectadas durante el 2009 -2010 65

Tabla 3. Detección del PCV2 por PCR convencional en muestras de suero y/o tejidos colectados entre el 2002 y el 2007 70

Tabla 4. Detección del PCVA por PCR convencional en muestras de suero y muestras de tejidos colectados durante el 2009 -2010 70

Tabla 5. Origen de las 23 cepas PCV2 colombianas examinadas en este estudio. 73

3. Caracterización molecular y biológica de aislamientos de campo del PCV2 en lechones privados de calostro

Tabla 1. Resumen de las lesiones histopatológicas encontradas en diferentes tejidos 114

Tabla 2. Detección del PCV2 por PCR convencional y tinción inmunohistoquímica en muestras de suero y tejidos de animales experimentalmente infectados con PCV2 CO3739	116
Tabla 3. Detección de anticuerpos frente al PCV2 por ELISA en muestras de suero de lechones experimentalmente infectados.	117
 4. Dinámica de la infección y respuesta de anticuerpos en Cerdas de reemplazo subclínicamente infectadas por el circovirus porcino tipo 2 y efecto en su progenie	
Tabla 1. Características de las granjas seleccionadas para la realización del estudio.	150
Tabla 2. Promedio de los títulos de anticuerpos neutralizantes (VNT50) en las muestras de suero precalostroal de los lechones neonatos evaluados	158
Tabla 3. Carga viral obtenida por la prueba PCR SYBR Green expresada como la media \log_{10} del número de copias de ADN del PCV2 /ml de ADN total en la muestra de cerdas de reemplazo hasta el primer parto.	160
Tabla 4. Carga viral obtenida por la prueba PCR SYBR Green expresados como la media \log_{10} del número de copias de ADN del PCV2 /ml o mg de ADN total en la muestra de los lechones nacidos vivos examinados.	161

Lista de Anexos

	Pág.
2. Detección y caracterización molecular del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en porcinos con el síndrome multisistémico de emaciación post-destete de Colombia	
Anexo 1. Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del PCV2	91
Anexo 2. Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del ORF2 del circovirus porcino tipo 2 (PCV2)	93
Anexo 3. Número de acceso al Gen Bank y origen geográfico de las 68 secuencias incluidas en el análisis filogenético de gen ORF2 del PCV2.	95
3. Caracterización molecular y biológica de aislamientos de campo del PCV2 en lechones privados de calostro	
Anexo 1. Procedimiento para el aislamiento del circovirus porcino tipo 2 (PCV2)	134
Anexo 2. Técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) para la detección del circovirus porcino tipo 2	137
Anexo 3. Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del circovirus porcino tipo 1 (PCV1)	139
Anexo 4. Técnica Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del PCV2	141
Anexo 5. Técnica Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del ORF2 del circovirus porcino tipo 2 (PCV2)	143
Anexo 6. Técnica de inmunohistoquímica para la detección del antígeno viral de PCV2 en tejidos	145

4. Dinámica de la infección y respuesta de anticuerpos en cerdas de reemplazo subclínicamente infectadas por el circovirus porcino tipo 2 y efecto en su progenie

Anexo 1. Técnica de seroneutralización para la detección de Anticuerpos frente al circovirus porcino tipo 2 181

Anexo 2. Técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) para la detección del circovirus porcino tipo 2 185

Anexo 3. Procedimiento para la prueba PCR tiempo real SYBR Green para la detección del PCV2. 187

Glosario

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADV: enfermedad de Aujeszky

AN: anticuerpos neutralizantes

APE: edema pulmonar maligno

ARN: ácido ribonucleico

ASOPORCICULTORES: Asociación Colombiana de Porcicultores

Cap: proteína de la cápside

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de virus

IFA: inmunofluorescencia indirecta

IFN- γ : interferon gamma

IgG: inmunoglobulina G

IHQ: técnica inmunohistoquímica

IL: interleucina

IPMA: inmunoperoxidasa indirecta en monocapa

M hyo: *Mycoplasma hyopneumoniae*

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

ORF: fragmento abierto de lectura

Ori: origen de replicación

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica

PCV: circovirus Porcino

PCV1: circovirus porcino tipo 1

PCV2: circovirus porcino tipo 2

PCV2a: circovirus porcino tipo 2, genotipo a

PCV2b: circovirus porcino tipo 2, genotipo b
PCV2c: circovirus porcino tipo 2, genotipo c
PCV2d: circovirus porcino tipo 2, genotipo d
PCV2e: circovirus porcino tipo 2, genotipo e
PCVAD: enfermedades asociadas al circovirus porcino tipo 2
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDNS: síndrome dermatitis nefropatía porcina
PK-15: células epiteliales de riñón porcino
PMWS: síndrome multisistémico de emaciación post-destete
PPC: peste porcina clásica
PPV: parvovirus porcino
PRRS: síndrome reproductivo y respiratorio porcino
PRRSV: virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino
Rep: proteína de la replicación
RFLP: longitud de los fragmentos de restricción
RT-PCR: transcripción reversa – PCR
RCR: mecanismo del círculo rodante
SVN: seroneutralización viral
SPF: libres de patógenos específicos
ssADN: cadena sencilla de ADN
TCID₅₀: dosis infectiva 50 cultivo celular.
TNF: factor de necrosis tumoral

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la circovirosis porcina en Colombia, aspectos moleculares y caracterización biológica de cepas de campo

Objetivos específicos

- Detectar y caracterizar a nivel molecular el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en porcinos con y sin el síndrome multisistémico de emaciación post-destete (PMWS) de Colombia.
- Caracterizar molecular y biológicamente los aislamientos de campo del PCV2 en lechones privados de calostro.
- Evaluar la dinámica de la infección y la respuesta de anticuerpos en cerdas de reemplazo subclínicamente infectadas por el circovirus porcino tipo 2 y el efecto en su progenie

1.Circovirusporcino tipo 2 (PCV2)

1.1 Historia y enfermedades asociadas al circovirus porcino

En 1974, Tischer y colaboradores descubrieron en la línea celular de riñón porcino PK-15 (ATCC-CCL33) un virus contaminante permanente con características morfológicas similares a un picornavirus (Tischer et al., 1974). Ocho años más tarde, el mismo grupo de trabajo demostró que el agente contaminante era un pequeño virus circular formado por una cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Tischer et al., 1982), el cual fue asignado a la familia Circoviridae (Lukert et al, 1995).

Posteriormente en 1991, se reportó en Canadá la aparición de una enfermedad emergente en porcinos, caracterizada por la pérdida progresiva de peso, dificultad respiratoria y palidez de la piel. Patológicamente, los animales mostraban linfadenopatía, neumonía intersticial, hepatitis, esplenomegalia y úlceras gástricas (Clark, 1997; Harding, 1997), este cuadro sistémico se reconoció como el Síndrome Multisistémico de Emaciación Post-destete (PMWS). Un año más tarde, se aisló un virus similar al contaminante de la línea celular PK-15 a partir de tejidos obtenidos de animales afectados por el PMWS en Norteamérica y Europa (Allan et al., 1998a; Ellis et al., 1998). Luego, mediante estudios de clonación y caracterización genética de aislamientos virales norteamericanos y europeos asociados con brotes de PMWS, se determinó que eran genética y antigénicamente distintos del virus contaminante de la línea celular PK-15 (Allan et al., 1998a; Meehan et al., 1998). En consecuencia, el circovirus porcino fue dividido en dos tipos: circovirus porcino tipo 1(PCV1), el contaminante de las células PK-15 y el circovirus tipo 2 (PCV2), el patógeno en porcinos (Hamel et

al., 1998; Meehan et al., 1998).

La prevalencia y nivel de infección del PCV1 en la población porcina a nivel mundial es desconocida. La amplia distribución de la infección por el PCV1 reportada en los primeros estudios publicados en la década de los años 90 (Hines et al., 1995; Tischer et al., 1995; Magar et al., 2000) contrasta con la baja prevalencia detectada recientemente en 180 explotaciones porcinas de levante/ceba de los Estados Unidos (Puvanendiran et al., 2011). Según estos autores, es posible que la reactividad cruzada entre los altos títulos de anticuerpos frente al PCV2 y el antígeno PCV1 magnificara los datos de prevalencia de los primeros estudios publicados, por lo tanto, es necesario emplear en los estudios epidemiológicos pruebas de laboratorio que permitan diferenciar los anticuerpos para ambos tipos de circovirus.

Se ha reportado el aislamiento del PCV1 en tejidos de lechones con tremor congénito (Hines et al., 1994), en tejidos fetales de lechones experimentalmente infectados (Allan et al., 1995) y en muestras de porcinos naturalmente afectados por el PMWS (Le Cann et al., 1997). En Hungría, durante los años 2002-2003, Csagola et al., 2006, detectaron ácido nucleico del PCV1 en tejidos de cerdos salvajes.

En la evaluación de vacunas comerciales utilizadas en porcinos, Quintana et al., 2006 describieron la presencia de ácido desoxirribonucleico del PCV1 (ADN PCV1) en una vacuna viva contra el virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV) y en una vacuna inactivada combinada (Parvovirus Porcino (PPV) - ADV-*Erysipelothrix rhusiopathiae*). En Taiwan (Wang et al., 2011), demostraron la contaminación de vacunas comerciales frente al virus de la Peste Porcina Clásica (CSFV) con ADN PCV1. Por otro lado, se encontraron secuencias del PCV1 en dos vacunas humanas contra el Rotavirus (Victoria et al., 2010) y en células MDBK obtenidas de centro de referencia internacional American Type Culture Collection, Estados Unidos (ATCC) utilizadas para la producción de vacunas animales (Ma et al., 2011). La detección de ADN PCV1 en las vacunas o en las

líneas celulares puede originarse por el uso del suero fetal bovino y tripsina contaminados con este agente (Quintana et al., 2006; Ma et al., 2011).

Con relación a la patogenicidad del PCV1, no se observaron signos clínicos atribuibles a la infección (Tischer et al., 1986; Allan et al., 1995; Fenaux et al., 2003) pero se logró demostrar la distribución del antígeno en tejidos de animales experimentalmente infectados (Allan et al., 1995). No obstante, en un estudio reciente donde se inocularon fetos a los 55 días de gestación, se observó replicación viral y la presencia de lesiones pulmonares a los 21 días post-infección (pi) (Saha et al, 2011).

En contraste con la baja patogenicidad del PCV1, el circovirus porcino tipo 2 virus se ha relacionado con diferentes manifestaciones clínicas agrupadas bajo la designación de enfermedades asociadas al Circovirus Porcino Tipo 2 (PCVAD), dentro de estas se encuentra: la forma sistémica (Chae, 2005; Harding, 2004; Harding and Clark, 1997; Madec et al., 2000; Segalés & Domingo, 2002), el síndrome dermatitis nefropatía porcina (PDNS) (Drolet et al., 1999; Segalés et al., 1998), enfermedad respiratoria (Harms et al., 2002; Kim et al., 2003), diarrea (Kim et al., 2004; Opriessnig et al., 2007), falla reproductiva (Brunborg et al., 2007; West et al., 1999; Mateusen et al., 2007). Recientemente, también fue reportado un nuevo síndrome hiperagudo, denominado edema pulmonar agudo (APE) en granjas con vacunación frente al PCV2, a diferencias de los cuadros clínicos previamente descritos este se caracteriza por la dificultad respiratoria seguido de muerte súbita en animales aparentemente sanos (Cino-Ozuna et al., 2011). Actualmente, la manifestación más común de la infección por el PCV2 es la forma subclínica, caracterizada por el bajo crecimiento y desarrollo de los animales en granjas aparentemente sanas (Young et al., 2011).

Hasta ahora, los estudios experimentales han demostrado asociación entre el PCV2 y el desarrollo del PMWS (Allan et al., 1999a; Bolin et al., 2001) así como con fallas reproductivas (Sánchez et al., 2001; Mateusen et al., 2007). La

asociación entre el PCV2 y otras condiciones clínicas se basa en estudios retrospectivos y/o en la evaluación clínica de casos, pero no se han obtenido evidencias experimentales de tal conexión (Segales et al., 2005a).

La emergencia de la infección por PCV2 ha producido incremento en la mortalidad post-destete y pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial (Horlen et al., 2007; Kixmüller et al., 2008) siendo una de las enfermedades de los porcinos más estudiadas en los últimos años.

1. 2 Origen y taxonomía

La detección reciente de secuencias semejantes a los circovirus integradas al genoma de varios mamíferos y ranas (Katzourakis & Gifford, 2010; Belyi et al., 2010) soporta la hipótesis del origen antiguo de los circovirus y genomas relacionados. Los virus de plantas de las familias Nanoviridae y Geminiviridae presentan una estructura en horquilla para el origen de replicación (Ori) del genoma circular y secuencias peptídicas que señala el origen evolutivo común con los circovirus (Gibbs & Weiller, 1999). En este estudio se encontraron similitudes entre nanovirus y circovirus en la región amino terminal (N-terminal) de la proteína de replicación (Rep.), pero el extremo carboxilo terminal (C-terminal) de Rep en los PCV, se asemeja más a una proteína de adhesión de un virus ARN (ácido ribonucleico) de cadena simple, sugiriendo como posible origen de los circovirus la recombinación entre un nanovirus de plantas y un calicivirus de vertebrados.

La familia Circoviridae, está conformada por un grupo de virus sin envoltura, que poseen una cadena monomérica de ADN circular y que se multiplican a través de secuencias replicativas intermediarias de doble cadena (Fauquet & Fargette, 2005). Hasta el presente y de acuerdo con el Comité internacional de Taxonomía para Virus (www.ictvdb.org) la familia Circoviridae está dividida en los géneros Circovirus y Gyrovirus (Figura 1). El género Circovirus afecta porcinos y

aves, tienen genoma en ambos sentidos y tanto el virion como las cadenas complementarias codifican para las proteínas virales. Los miembros del género Gyrovirus (virus de la anemia infecciosa de las aves y el recientemente reportado gyrovirus humano (Sauvage et al., 2011), poseen un genoma en sentido negativo y únicamente la cadena positiva complementaria codifica para las proteínas virales. En el año 2010, se identificó un nuevo virus con genoma en ambos sentidos que infecta humanos y chimpancés denominado Cyclovirus, incluido como un nuevo miembro de la familia Circoviridae (Blinkova et al., 2010; Li et al., 2010).

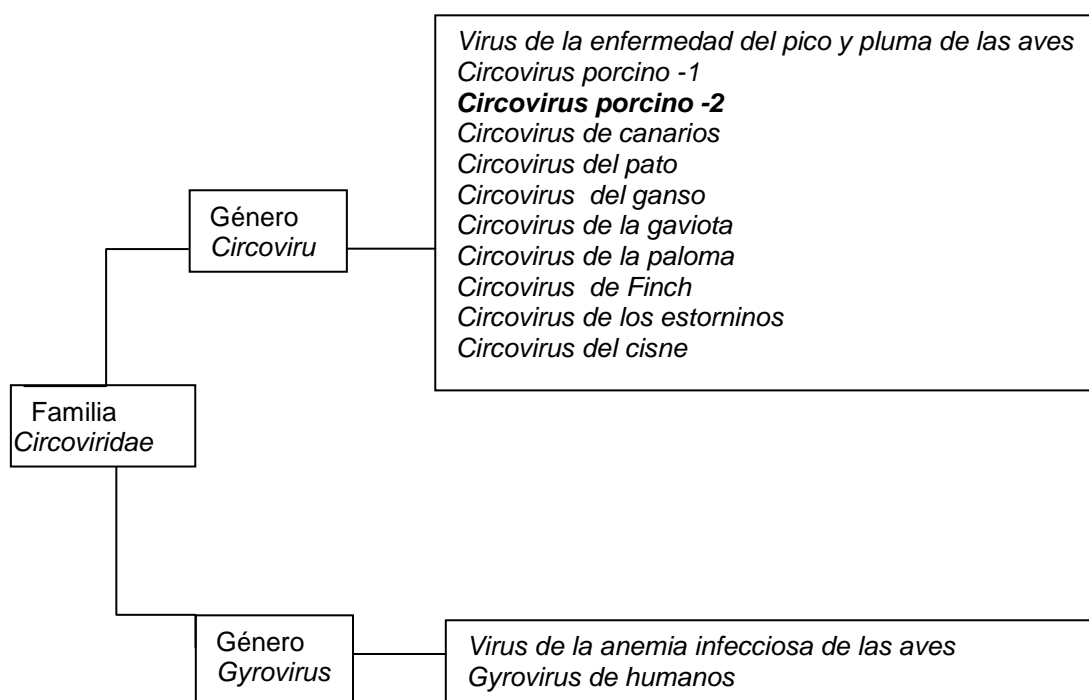
Recientemente, los estudios de caracterización del genoma de varios circovirus, cyclovirus y otros virus circulares sencillos ADN revelaron una amplia variabilidad genética y diversidad de huéspedes dentro de la familia Circoviridae (Ge et al., 2011), algunos investigadores sugieren que la diversidad genética podría facilitar la transmisión entre otros mamíferos y aves, así como la exposición del humano a través de heces y alimento contaminado (Delwart & Li, 2011). Igualmente, un exhaustivo análisis de secuencias publicadas en la base de datos del NCBI reveló la presencia de secuencias virales semejantes a Rep en un amplio rango de genomas de plantas, hongos y animales indicando que las secuencias sencillas de ADN viral pueden actuar como fuentes imprevistas de innovación genética en sus huéspedes (Liu et al., 2011).

1. 3 Morfología y organización molecular

El PCV2 es uno de los virus más pequeños conocidos hasta el momento, tiene forma icosaédrica, un diámetro de 16 – 18 nm y no tiene envoltura (Tisher et al., 1982). Su genoma es una cadena sencilla de ADN circular, de 1766 – 1768 nucleótidos de longitud (Meehan et al., 1998; Shang et al., 2009). La organización genómica del PCV1 y el PCV2 es similar, el origen de replicación del ADN está representado por una estructura en horquilla asociado con varios factores de replicación cis, el tallo está formada por una secuencia palindrómica de 11 pb,

mientras que el ápex contiene 10 – 12 nt (10 en el PCV2) con una secuencia de octanucleótidos altamente conservada (A1x2T3A4x5T6↓A7C8) (Oc8) donde se ubica un sitio específico de escisión (↓ indica el sitio de ruptura). A la derecha del tallo se encuentra una secuencia repetitiva de hexámeros que sirve como sitio de ligación para las replicasas virales (Cheung, 2012).

Figura 1. Clasificación taxonómica del PCV2 (www.ictvdb.org)



En la molécula de ADN se han descrito once potenciales marcos abiertos de lectura (ORF) (Hamel et al., 1998; Zhou et al., 2006). Los dos principales marcos abiertos de lectura divergen en sentido opuesto, sus terminaciones 5' están separadas por la región Ori y las terminaciones 3' por una corta región intergénica (IR). El ORF1 (nucleótidos 51 - 995) codifica para las proteínas Rep (37.5 kDa) y Rep' (20.2 kDa), formadas por 314 (312) y 178 (168) residuos de aminoácidos (aa) respectivamente, las cuales están implicadas en la replicación del virus (Cheung, 2003; Hamel et al., 1998). El ORF2 (nucleótidos 1735 – 1034) codifica para la única proteína estructural de la cápside (Cap), formada por 233 –

235 aa con una masa molecular de 27.8 kDa (Hamel et al., 1998; Nawagitgul et al., 2000; Lefebvre et al., 2008). El ORF3 (nucleótidos 671 – 357) codifica para una proteína estructural de 102 - 104 aa con un peso de 11.8 kDa (Hamel et al., 1998). Esta última ha sido involucrada en mecanismos de apoptosis (Liu et al., 2005, 2006) sin embargo, esta función es controversial para otros investigadores (Juhan et al., 2010).

La proteína Rep contiene secuencias conservadas de aminoácidos distintivos (motif) designadas como RC-I, RC-II, RC-III y P-loop esenciales para la replicación del ADN viral a través del mecanismo de circulo rodante (RCR). Se desconoce la función de RC-I, pero RC-II actúa como regulador iónico divalente; RC-III contiene un residuo de tirosina para la introducción de un corte en Ori y la unión covalente al extremo 5' de la hebra de ADN desplazada; finalmente, P-loop exhibe actividad helicasa en presencia de iones divalentes (del Solar et al., 1998; Gutierrez, 1999; Ilyina and Koonin, 1992; Mankertz et al., 1998; Steinfeldt et al., 2007). La proteína Rep' es traducida a partir del empalme alternativo de un ARN interno en ORF1, contiene secuencias RC-1, RC-II, RC-III pero no P-loop.

En el gen de Cap, también se han detectado elementos reguladores en Cis (Sp1, TATA, ISRE y USF/MLTF), comúnmente asociados con promotores de organismos eucariontes (Mankertz & Hillenbrand, 2002). Recientemente, se describió la estructura cristalina de una subunidad monomérica de CP y su orientación dentro de una partícula semejante a PCV2; en este modelo, 60 unidades de CP forman un icosaedro con una simetría T=1 (Khayat et al., 2011). Las proteínas de la cápside encapsulan el ssADN viral para formar los viriones infecciosos y parecen estar implicadas en el transporte de las proteínas Rep y Rep' al núcleo durante la replicación del virus (Cheung & Greenlee, 2011; Lin et al., 2009).

Cuando se ha comparado diferentes cepas de PCV2, en Rep se ha encontrado una identidad a nivel de nucleótidos y aminoácidos entre el 97 – 100 %. Por su parte, en Cap, la identidad es del 91 – 100% para nucleótidos y del 89 – 100% para aminoácidos (Larochelle et al., 2002).

1. 4 Transcripción y replicación

El modelo de transcripción de los circovirus es muy compleja, la síntesis de ARN se lleva a cabo por enzimas celulares luego que la cadena sencilla de ADN es convertida en una molécula doble de ADN (dsADN) en el nuevo huésped (Cheung, 2012). La estrategia de transcripción es bidireccional y varios ARN son producidos por empalme alternativo. Durante la infección productiva del PCV2 en células PK-15 se caracterizaron nueve ARNs: el ARN para la proteína de la

capside (CR), un grupo de cinco ARNs asociados a Rep (Rep, Rep, Rep3a, Rep3b, y Rep3c) y tres ARN asociados a la nucleocápside (NS515, NS672 y NS0). El ARN Rep codifica para toda la longitud de la proteína asociada a la replicación y parece ser el transcrito primario del cual se derivan por empalme alternativo los otros siete ARNs asociados a Rep. En el caso de NS462, NS642 y NS0 estos se transcriben a partir de tres promotores independientes de Rep, presentes en el ORF1 (Cheung, 2003). Las modificaciones (mutaciones) introducidas en estos ARNs han revelado que solo Rep y Rep' son esenciales para la replicación del ADN viral (Cheung, 2003b, 2004c; Liu et al., 2005). Los polipéptidos codificados por rep, rep', cap y el ARN del ORF3 ya han sido caracterizados, pero hasta el momento no se conocen las proteínas codificadas por los ARN menores ni su función en el ciclo de vida de los circovirus porcinos (Cheung, 2012).

Las proteínas Rep y Rep' se unen a las secuencias dobles de ADN en el Orí de los PCV con diferente grado de especificidad, (Finsterbusch et al., 2005; Steinfeldt et al., 2001). Rep se une al brazo derecho de la secuencia palindrómica y las secuencias hexaméricas H1/H2, mientras que Rep' solo se une a las

secuencias hexaméricas. En condiciones *in vitro*, ambas proteínas, exhiben actividad de corte y empalme a nivel de la secuencia sencilla de Oc8 (ssOc8) en Ori y pueden unirse de forma covalente al punto de corte del ADN después de su escisión (Steinfeldt et al., 2007). Además, poseen actividad nucleotidil transferasa para ligar nuevamente ssOc8, siempre y cuando la proteína este covalentemente unida al extremo 5' del Oc8 cortado y en presencia de la estructura en horquilla de cadena sencilla. También se ha demostrado que la proteína Rep puede modular su propia transcripción por represión de su promotor a través de RCI y P-loop (Mankertz & Hillenbrand, 2002).

Se ha observado también, que la proporción de los ARN Rep y Rep' durante el ciclo de replicación viral es variable sugiriendo la formación de homocomplejos (Rep-Rep, Rep'-Rep') y heterocomplejos (Rep – Rep') referidos comúnmente como Complejo-Rep. Cada complejo puede jugar un rol específico durante cada la replicación del ADN viral (Mankertz & Hillenbrand, 2002). En los circovirus el proceso de replicación se lleva a cabo por enzimas celulares expresadas durante la fase S del ciclo celular (Tischer et al., 1987). Luego de la infección ocurre la decapsulación del virion y la ssADN es transportada al núcleo.

Los circovirus replican su genoma a través del mecanismo del círculo rodante (RCR), un proceso utilizado por plámidos bacterianos, fagos y por algunos virus de plantas y animales (del Solar et al., 1998; Graham et al., 1989; Hanley-Bowdoin et al., 2000; Khan, 2000; Musatov et al., 2000; Novick, 1998). En el primer paso, la molécula sencilla de ADN es convertida a moléculas intermediarias de doble cadena las cuales adquieren una estructura superhelicoidal que sirve como template para la síntesis de ADN viral. En los geminivirus y nanovirus esta conversión es iniciada por cebadores mínimos compuestos de ADN o ADN con diversos 5' ribonucleótidos empaquetado en el virion (Donson et al., 1984; Hafner et al., 1997) o alternativamente por un cebador de ARN sintetizado en el huésped después de la infección (Saunders et al., 1992). Un mecanismo similar podría presentarse en los circovirus, pero hasta el

momento no se ha determinado el origen de estos cebadores (Cheung, 2012).

Para iniciar la síntesis del nuevo ADN, el complejo Rep se debe unir a las dobles cadenas intermediarias de los hexanucleótidos H1/H2 (Steinfeldt et al., 2007), esta interacción induce cambios conformacionales (configuración de triple horquilla-modelo “melting- pot”) a nivel del Oc8 para permitir la escisión de la cadena de ADN (Steinfeldt et al., 2006). La ruptura del enlace fosfodiéster entre T6 y A7 de la cadena original se cataliza mediante un ataque nucleotídico del grupo hidroxilo (-OH) de la tirosina 93 presente en RC-II de la proteína Rep. Luego del corte, Rep se une covalentemente al extremo 5' del ADN cortado a través de un enlace tirosina-fosfodiéster y se genera un extremo libre 3'- OH que sirve como cebador para la primera ronda de la síntesis de ADN (Steinfeldt et al., 2006). Como las proteínas Rep y Rep' no tienen actividad polimerasa, se presume que enzimas celulares realicen la extensión del ADN (Cheung, 2012). La terminación del proceso de replicación ocurre con la síntesis de la estructura de horquilla de la nueva cadena y el desplazamiento de la cadena original de ADN (Cheung, 2007; Steinfeldt et al., 2006), sin embargo se desconoce los eventos que acaecen en la culminación del proceso.

1. 5 Clasificación genética

Los estudios comparativos entre genomas publicados en el Gen Bank demostraron que la similitud genética a nivel de nucleótidos entre virus PCV2 puede ser mayor al 93% intragrupo (Meehan et al., 1998), sin embargo, los estudios genéticos con aislamientos de diferentes regiones geográficas reportan variaciones en las secuencias (Hamel et al., 1998; Mankertz et al., 2000; Guo et al., 2010). Dado que el Comité Internacional de Taxonomía de virus (ICTV) no establece una clasificación de los circovirus por debajo del nivel de especie, históricamente se han utilizado diferentes nomenclaturas para los dos principales genotipos del PCV2 dependiendo de los autores o la técnica de laboratorio utilizada (Tabla 1). Actualmente se utiliza el sistema de nomenclatura unificado

propuesto por Segalés et al., 2008 que estableció tres genotipos: PCV2a, PCV2b y PCV2c. El número de acceso al Gen Bank de la cepa prototipo para cada genotipo se presenta en la Tabla 2.

La ubicación de un aislamiento dentro de un genotipo se basa en la comparación de pares de bases diferentes, para determinar el grado de distancia genética (p), este valor se obtiene dividiendo el número de nucleótidos diferentes sobre el número total de nucleótidos comparados (Kumar et al., 2001).

Tabla 1. Nomenclatura publicada para los principales genotipos de PCV2

PCV2a	PCV2b	Referencia
PCV2 II	PCV2 I	De Boissésón et al., 2004
PCV2 grupo 2	PCV2 grupo 1	Olvera et al., 2007
PCV2 B	PCV2 A	Martins Gomes de Castro et al., 2007
PCV2 RFLP 422	PCV2 RFLP 321	Carman et al., 2008
PCV2 SG3	PCV2 SG 1/2	Timmusk et al., 2008
PCV2 genotipo 2	PCV2 genotipo 1	Grau-Roma et al., 2008

Tabla 2. Secuencias prototipos para los genotipos del PCV2

Número en el Gen Bank	Genotipo	País de origen	Referencia
AF055391	2a	Estados Unidos	Meehan et al., (1998)
AF055393	2b	Francia	Meehan et al., (1998)
EU148503	2c	Dinamarca	Dupont et al., (2008)

En la actualidad, existen dos métodos de clasificación para distinguir los genotipos de PCV2, uno se basa en el análisis completo del genoma de PCV2, donde se utiliza un valor $p = 0,02$ como punto de corte, para distinguir los genotipos (Grau-Roma et al., 2008). La otra metodología se basa en la

variabilidad genética reportada en el ORF2 (Fenaux et al., 2000; Hamel et al., 2000; Larochelle et al., 2002; Mankertz et al., 2000), donde el punto de corte se incrementa hasta $p = 0.035$ (Segalés et al., 2008). Cuando se comparó el mapa genético del genoma completo del PCV2 y la secuencia de nucleótidos del ORF2, no se encontró diferencias significativas entre los dos métodos de clasificación propuestos (Olvera et al., 2007).

En el 2008, un estudio retrospectivo realizado en Dinamarca identificó un tercer genotipo (PCV2c) en las tres únicas secuencias reportadas hasta el momento en el Gen Bank (Dupont et al., 2008). Recientemente se han descrito en China dos genotipos adicionales designados como PCV2d y PCV2e, tras el análisis de secuencias obtenidas entre el 2004 – 2008 (Guo et al., 2010; Wang et al., 2009). Luego se reportó la construcción *in vitro* de un clon infeccioso elaborado con una cepa clasificada como PCV2d (Guo et al., 2011) y la coexistencia de cepas PCV2a/b, PCV2a/d, PCV2e/d en un mismo animal (Zhai et al., 2011), sin embargo los análisis genéticos realizados por Cortey et al., 2011, no sustentan la designación de los nuevos genotipos reportados en China.

Adicionalmente, dentro del genotipo PCV2a se han establecido cinco grupos designados como PCV2 grupo 2 A –E y en el genotipo PCV2b, tres grupos denominados PCV grupo 1 A, B y C. En este sistema de clasificación, la distancia entre grupos (valor de p) es 0.0158 para PCV2a y 0.0234 para PCV2b (Olvera et al., 2007). Sin embargo, debido al surgimiento de variantes y a los eventos de recombinación genética, la agrupación de los virus bajo este sistema de clasificación se considera compleja (Cai et al., 2011; Hesse et al., 2008; Lefebvre et al., 2009; Ma et al., 2007).

Como en otros miembros de la familia Circoviridae (Heath et al., 2004), en los PCV2 ocurren fenómenos de recombinación natural que contribuyen a la variación genética de la especie, lo cual implica la coinfección de las células con virus PCV2a y PCV2b (Horlen et al., 2007; Hesse et al., 2008). La descripción de

virus que presentaban secuencias de PCV2a y PCV2b fue inicialmente reportada en tres cepas aisladas de cerdos con signos clínicos de PMWS en Hong Kong (Ma et al., 2007), en este estudio se estimó que los puntos de corte para la recombinación podrían ubicarse dentro del origen de la replicación (nt 1737) y el gen de la replicasa del PCV2 (nt 391). La ocurrencia natural de virus quiméricos formados por diferentes genotipos, parecía ser un fenómeno relativamente frecuente en las granjas porcinas donde coexisten diferentes cepas (Cheung et al., 2009, Gagnon et al., 2010; Hesse et al., 2008, Kim et al., 2009), evento que también ha sido reportado en la infección *in vitro* de células PK15 con cepas de ambos genotipos (Lefebvre et al., 2009).

La plasticidad del genoma del PCV2 fue establecida mediante la identificación de virus quiméricos que contenían el ORF1 del PCV1 y el ORF2 del PCV2a (PCV1/2a) en cerdos con infección subclínica en granjas ubicadas en la provincia de Quebec – Canadá. Como posible causa se sugirió la recombinación de cepas endémicas con ADN o el genoma completo residual presente en la vacuna quimérica muerta o inactivada empleada en las explotaciones porcinas (Gagnon et al., 2010). En Rumania, también se identificaron eventos de recombinación natural intra-genotipo (PCV2b-1B/PCV2b-1C) o inter - genotipo (PCV2a-2D/PCV2b-1C) en cerdos salvajes. En porcinos domésticos, se encontró un posible recombinante originado en cerdos salvajes; el estudio sugirió la posible transmisión de cepas recombinantes entre ambas especies (Cadar et al., 2011).

Estudios previos habían sugerido la presencia de “puntos calientes” para la recombinación, ubicados justo a la izquierda de Ori y en el gen de la replicasa (Ma et al., 2007) y en puntos de ruptura identificados en el ORF1 y ORF2 (Cheung et al., 2009, Gagnon et al., 2010, Lefevre et al., 2009, Olvera et al., 2007) sin embargo, las investigaciones posteriores en modelos experimentales, indicaron que cualquier posición del genoma puede ser un punto de corte para el intercambio genético entre distintos grupos del PCV2 (Cai et al., 2011).

1.6 Diferencias moleculares y patogenicidad

Los dos genotipos pueden ser fácilmente distinguibles con base en una secuencia característica en ORF2, PCV2b tiene la secuencia de TCA / AAC / CCC / CG en la posición 1486-1472 del genoma viral mientras que PCV2a tiene la secuencia del CAC / AAC / AAA / AT en la posición 1487-1473. Las secuencias de nucleótidos se traducen en las secuencias peptídicas, 86-SNPRSV para PCV2b y 86 TNKISI para PCV2a (Cheung et al., 2007). Estos motivos particulares han sido útiles en el diagnóstico para diferenciar los dos genotipos pero su asociación con la virulencia todavía no se ha demostrado.

Otra característica distintiva entre genotipos es el tamaño de los genomas, PCV2b y PCV2c tiene una longitud de 1767 pb, mientras que PCV2a contiene 1768 nts (Dupont et al., 2008; Meehan et al., 1998, Tischer et al., 1986). Los genotipos PCV2d y PCV2e descritos en China tienen una longitud de 1767 y 1768 pb respectivamente (Zhai et al., 2011).

A nivel de nucleótidos, los genotipos PCV2a y PCV2b presentan una identidad de aproximadamente el 95%. La principal diferencia entre ambos genotipos ocurre en el ORF2 con identidad en nucleótidos y aminoácidos del 90% (Trible et al., 2012). El estudio filogenético de 148 secuencias completas del PCV2 publicadas en el Gen Bank (Olvera et al, 2007), identificó 52 posiciones distintivas entre los dos genotipos, 33 localizadas en el gen Cap, 13 en Rep y 6 en el resto del genoma; la mayor variabilidad genética en el gen Cap se podría explicar por presión selectiva ya que es la parte más expuesta del virus al sistema inmune del huésped.

Hasta el presente, no hay ninguna relación entre genotipo del PCV2 y el estado de enfermedad o área geográfica (Olvera et al, 2007; Timmusk et al., 2008). Sin embargo, en algunos países la aparición de brotes de enfermedad se asoció con el cambio del PCV2a al PCV2b, por ejemplo en Suiza en el 2003 (Wiederkehr et

al., 2007), en Canadá en el 2005 (Ellis et al., 2006) y en EE.UU en el 2005 (Cheung et al., 2007; Horlen et al., 2007).

Dilucidar los mecanismos moleculares de la patogénesis del PCV2 ha sido difícil debido a que la infección solo por el PCV2 normalmente no da lugar a enfermedad. Los primeros estudios describen la atenuación de un virus PCV2a en células PK15, luego de 120 pasajes. En la infección experimental de cerdos libres de patógenos específicos (SPF) con este virus, se observó menor carga de viremia y menos lesiones macroscópicas e histopatológicas en comparación con animales inoculados con el virus original. Se identificaron solamente dos mutaciones de nucleótidos en el gen de la cápside, uno en la posición 328 (C328G) y otro en el sitio 573 (A573C), en la primera hubo una variación de prolina a alanina y en la segunda un cambio de arginina a serina (Fenaux et al., 2004).

En la infección experimental de cerdos convencionales con diferentes virus PCV2a y PCV2b, se evidenció a través de la evaluación de lesiones en tejidos linfoides que la patogenicidad de las cepas no depende del genotipo sino probablemente de las propiedades individuales de cada cepa (Opriessnig et al., 2008b). Estudios de infecciones heterológicas (PCV2a/PCV2b) mostraron que la coinfección puede inducir enfermedades más severas que la infección por un solo genotipo (Harding et al., 2010). Y en un estudio de evaluación Khaiseb et al., 2011, observaron por hibridación *in-situ* que los tejidos de cerdos enfermos mostraron células co-infectadas con ambos genotipos, mientras que en los tejidos de porcinos infectados subclínicamente las células marcaban para un solo genotipo. Estos hallazgos sugirieron un mecanismo de cooperación aún desconocido entre genomas de diferentes genotipos.

La posible participación del ORF1 en la patogénesis viral fue evaluada a través de experimentos realizados en lechones SPF con un virus quimérico que contenían el ORF1 del PCV1 y el ORF2 del PCV2a (Fenaux et al., 2003). A pesar que el virus quimérico mostró atenuación en comparación con el PCV2a

original, una atenuación similar se observó cuando la quimera contenía el ORF1 del PCV2 y el ORF2 del PCV1.

Por otro lado, la proteína codificada por el ORF3 se ha caracterizado como un inductor de apoptosis en células infectadas por el PCV2 (Liu et al., 2005). Experimentos realizados con ratones BALB/c (Liu et al., 2006) y con lechones SPF (Karuppannan et al., 2009) demostraron que la derogación de la expresión del ORF3 en el PCV2 atenuaba la patogenicidad del virus. Esto condujo a la hipótesis del papel del ORF3 en la liberación temprana de virus en células infectadas mediante la apoptosis, lo cual facilitaría el reconocimiento por parte de los macrófagos y la diseminación sistémica de la infección (Karuppannan & Kwang, 2011).

1. 7 Epítomos de anticuerpos y diferencias antigénicas

A través de análisis PEPSCAN incorporando la síntesis de péptidos superpuestos de un aislamiento PCV2b y la reacción con antisueros específicos PCV1 y PCV2 (Mahé et al., 2000), se reportó que los residuos localizados en las posiciones 65 - 87, 113 - 139 y 193 - 207 de la proteína Cap eran importantes para el reconocimiento de anticuerpos. Un epítipo localizado en la posición 169 -183 fue reconocido por ambos antisueros. Luego se identificó otra región inmunodominante de Cap en los residuos 117 a 131 (Trung et al., 2001).

En otro estudio, Lekcharoensuk et al., 2004 usaron un panel de siete anticuerpos monoclonales para mapear los epítomos de la proteína de la cápside en células transfectadas con clones conformados por diferentes combinaciones de secuencias ORF2 del PCV1 y PCV2a; en este estudio se reportaron tres regiones inmunoreactivas en la proteína Cap localizadas entre los residuos 47 - 85, 165- 200 y 200 - 233. Posteriormente, se reportó la presencia de epítomos neutralizantes para el PCV1 y PCV2 en la proteína de la cápside del PCV1 y del PCV2 en los residuos 156 - 162 y 175 - 192 mientras que los residuos 195 -

202 y 228 – 233 son un sitio antigénico neutralizante únicamente para el PCV2 (Shang et al., 2009). En general, todos estos estudios han contribuido a identificar en Cap cuatro dominios para el reconocimiento de anticuerpos identificados como A, B, C y D (Trible et al., 2012).

1. 8 Propiedades biológicas y fisicoquímicas

En general, el PCV2 es muy estable a las condiciones del ambiente, sin embargo la infectividad se ve reducida por exposición del virus a temperatura de pasteurización (Welch et al., 2006) pero permanece durante largos periodos en muestras de tejidos mantenidos a -70°C (Ellis et al., 1998). Al evaluar la susceptibilidad del PCV2 frente a desinfectantes comunes se observó que el tratamiento con clorhexidina, alcohol y yodo es menos efectivo comparado con álcalis (hidróxido de sodio), agentes oxidantes y amonio cuaternario (Royer et al., 2001). En otro estudio se observó la eficacia de productos como el monopersulfato de potasio y la combinación de ácido peracético y peróxido de hidrógeno (Martin et al., 2008).

1. 9 Infecciones asociadas al PCV2

Como en otras enfermedades, la presentación clínica de las infecciones asociadas al PCV2 ha variado con el tiempo, mientras en los años 90 y hasta el 2003 (Clark, 1996; Harding, 1996, 2004), la enfermedad se caracterizaba por un incremento en el porcentaje de mortalidad y cerdos retrasados en la etapa de crecimiento en un número relativamente alto de granjas, esta situación ha ido cambiando con el tiempo, de manera que hoy en día estos porcentajes son generalmente menores y en un número más limitado de granjas (Segales, 2012).

1.10 Signos clínicos y lesiones

La infección por PCV2 es ubicua en las explotaciones porcinas a nivel mundial (Segalés et al., 2005a), mientras que la prevalencia de la enfermedad clínica es mucho menor. Las evidencias de campo indican que la vacunación frente al

PCV2 en granjas afectadas, es capaz de mejorar los parámetros productivos (ganancia diaria de peso, el porcentaje de cerdos atrasados, la condición corporal y el peso en canal), lo cual se relaciona con estados de infección subclínica (Young et al., 2011).

Por otro lado, diferentes síndromes clínicos han sido relacionados con el PCV2, el más frecuentemente reportado es el PMWS, descrito en la literatura como circovirus porcina (Rosell et al., 2000b), infección sistémica asociada al PCV2 (Opriessnig et al., 2007) o enfermedad asociada al circovirus porcino (PCVAD) (Carman et al., 2008). Otras condiciones patológicas en las cuales se ha involucrado este virus son: el síndrome dermatitis nefropatía porcina (Smith et al., 1993, Roll et al., 2000), falla reproductiva (Mateusen et al., 2007; O'Connor et al., 2001; West et al., 1999), neumonía proliferativa y necrotizante (Grau-Roma & Segalés, 2007; Szeredi & Szentirmai, 2008), enfermedad respiratoria (Cheng et al., 2011; Kim et al., 2003; Wellenberg et al., 2010) y enteritis (Kim et al., 2004; Opriessnig et al., 2007).

En la necropsia, los cambios más notables son la linfadenopatía y la ausencia de colapso pulmonar (Rosell et al., 1999). En los cerdos infectados de forma natural o experimental con el virus se puede evidenciar lesiones microscópicas en tejidos linfoides como depleción linfoides, miocarditis, linfadenitis necrotizante y la inflamación granulomatosa (Segalés et al., 2004, Opriessnig et al., 2006b). También se puede observar agrandamiento renal bilateral con petequias corticales y edema de la pelvis renal (Segalés et al., 2012). Las lesiones renales pueden ser muy llamativas en los casos PDNS; microscópicamente se evidencia glomerulitis fibrino-necrótica no supurativa, nefritis intersticial y vasculitis necrotizante en la pelvis renal (Drolet et al., 1999; Segalés et al., 1998).

Ocasionalmente, los animales infectados pueden presentar atrofia o aumento de tamaño del hígado y coloración amarillenta en casos de ictericia (Rosell et al., 1999). En algunos casos se han reportado lesiones cerebrales como meningitis y

vasculitis linfocitocitaria (Correa et al., 2007; Seeliger et al., 2007) o degeneración y necrosis de la sustancia gris y blanca asociada con vasculitis necrotizante (Seeliger et al., 2007). En lechones lactantes se ha descrito falla cardíaca asociada miocarditis necrótica aguda o crónica con vasculitis necrótica en corazón, riñón y tejidos linfoides (Opriessnig et al., 2006b).

1.11 Transmisión

El PCV2 tiene la habilidad de transmitirse a través de diferentes vías sin embargo la infectividad depende de factores como la susceptibilidad del huésped, la patogenicidad de la cepa así como la forma y tipo de exposición (Thrusfield, 1995). Los estudios de infección experimental han demostrado que el PCV2 es excretado a través de las diferentes secreciones (Shibata et al, 2003) tanto de animales enfermos como de porcinos con infección subclínica, pero la cantidad de virus eliminado es mayor en animales con signos clínicos asociados al PCV2 (Segales et al., 2005).

En un estudio experimental realizado en lechones obtenidos por cesárea y privados de calostro inoculados con PCV2 entre los 20 a 25 días de edad, se logró aislar el virus a partir de hisopados nasales, rectales y de tonsila entre los 12 -19 dpi. La exposición de lechones no infectados con un grupo de cerdos inoculados 42 días antes con el virus, demostró la transmisión horizontal por contacto directo entre animales infectados y susceptibles (Bolin et al., 2001). Por su parte, Yang et al., 2003, reportaron la detección del ADN viral en el tracto digestivo de cerdos con y sin enfermedad entérica sugiriendo la importancia de las heces en la transmisión oro- fecal del agente.

Recientemente, se evaluó la eliminación viral a través de las rutas oral, nasal y fecal así como la carga viral en el suero de cerdos infectados experimentalmente (Patterson et al., 2011c) y en animales infectados por el PCV2 de forma natural (Patterson et al., 2011b). En el estudio experimental se pudo detectar ADN viral

durante todo el periodo del estudio (69 días) y cuando se inocularon cerdos con muestras colectadas a los 21 dpi se observó viremia y seroconversión. La infección natural resultó en eliminación a través de los 209 días del estudio con cargas de eliminación similares a través de las rutas oral, nasal y fecal.

En reproductores infectados en forma natural y experimental también se ha demostrado la eliminación del PCV2 a través del semen (Larochelle et al., 2000; Madson et al., 2008; McIntosh et al., 2006; Schmoll et al., 2008). Luego de la inoculación intranasal de cuatro verracos, se logró evidenciar por PCR anidada, la eliminación intermitente del PCV2 a través del semen desde los cinco días pi hasta los 47 dpi. (Larochelle et al., 2000). En otro ensayo se evaluó la eliminación del PCV2 a través del semen en reproductores de siete meses inoculados por la vía intranasal e intramuscular con virus PCV2a o PCV2b. En este estudio se pudo detectar mediante una prueba PCR en tiempo real (qPCR) el ADN viral hasta los 56 y 81 dpi respectivamente. Aunque la incidencia y duración de la eliminación vario entre animales, la eliminación no fue intermitente (Madson et al., 2008). En otro trabajo de seguimiento de la infección natural por PCV2 en reproductores (McIntosh et al., 2006), se reportó la eliminación viral a través del semen por un periodo de 27.3 semanas, siendo más significativa en reproductores menores de 52 semanas de vida.

Por otro lado, cuando se investigó la eliminación del virus a través de la leche en seis cerdas con 93 días de gestación infectadas experimentalmente, se detectó eliminación viral en la leche desde el día uno hasta los 27 días pi (Ha et al., 2009a). En un estudio similar, se confirmó la presencia de ADN y proteínas virales en leche desde el primer día así como en la glándula mamaria sugiriendo la posible replicación del virus en ese tejido (Park et al., 2009). De igual manera, se ha comprobado la excreción del PCV2 a través del calostro (Shibata et al., 2006; Gerber et al., 2011). Estos hallazgos sugieren que la transmisión del virus por la vía oral en lechones jóvenes puede ocurrir a través del consumo de calostro y leche de cerdas infectadas (Shibata et al., 2006; Gerber et al., 2011).

Experimentalmente, también se ha demostrado que el virus puede transmitirse de forma vertical a través de la inoculación *in útero* de fetos (Johnson et al., 2002; Sanchez et al., 2001, 2003) o mediante la infección intranasal de cerdas preñadas, antes del parto (Ha et al., 2008; Park et al., 2005).

1.12 Patogénesis

Los lechones se pueden infectar con el PCV2 durante la vida prenatal o postnatal, dando lugar a diferentes manifestaciones clínicas de enfermedad (Segales et al., 2005a). Desde muy temprano, las células embrionarias son susceptibles al PCV2 pero resisten a la infección, siempre y cuando estén dentro de la zona pelúcida (Mateusen et al., 2004). En los fetos jóvenes de 40 – 70 días de gestación, el virus se replica principalmente en el corazón, seguido del hígado, los órganos linfoides y los pulmones (Sánchez et al, 2001, Saha et al, 2010). Las células diana principales en esa etapa son los cardiomiocitos, hepatocitos y las células del linaje monocítico (Sánchez et al., 2003). Luego del nacimiento, el tropismo celular se centra principalmente en linfoblastos y células de la línea celular monocítica, los primeros son totalmente susceptibles mientras que en las células del linaje monocítico la presencia de partículas virales rara vez conduce a una infección productiva (Sánchez et al, 2004; Lefebvre et al, 2008b).

La adhesión del PCV2 a la célula huésped esta mediada por glicosaminoglicanos, heparán sulfato y condroitín sulfato B que actúan como receptores celulares para la adherencia del PCV2 a la célula huésped (Misinzo et al., 2006). La internalización se da por vía endocítica y depende completamente del tipo de célula. En células de la línea celular monocítica 3D4/31 es un proceso dependiente de clatrina (Misinzo et al., 2005) mientras que en células de origen epitelial como PK15, células de riñón porcino (SK) y células de testículo porcino (ST) puede seguir dos vías de internalización: una mediada por clatrina y otra

dinamina y colesterol independiente pero dependiente de actina y una pequeña GTPasa (Misinzó et al., 2005). En los monocitos, macrófagos, células dendríticas y monocitos derivados de la médula ósea, se sabe que el PCV2 entra en la célula, pero el mecanismo de ingreso aún no se ha dilucidado (Meerts et al., 2005a,b; Steiner et al., 2008; Vicente et al., 2003).

Luego de su ingreso a la célula 3D4/31, el PCV2 es liberado del endosoma en un ambiente ácido (Misinzó et al., 2005) pero en las células epiteliales PK15, SK, ST y células renales primarias de porcino se demostró a través de experimentos de inhibición química del sistema endosoma- lisosoma que al inhibir la acidificación se incrementaba la replicación viral (Misinzó et al., 2008a). Al parecer, el desamblaje viral depende del tipo de célula, de las condiciones de pH y la participación de proteasas que actúan en diferentes circunstancias del ambiente endosomal; en células epiteliales activas ocurre en medio neutro y en células monocíticas activas a pH bajo (Misinzó et al., 2005, Misinzó et al., 2008a). En monocitos, macrófagos, monocitos y células dendríticas derivadas de médula ósea se bloquea el desamblaje del PCV2 sin que hasta el momento exista una explicación del proceso (Nauwynck et al., 2012).

Los estudios de la interacción molecular entre los circovirus porcinos y el huésped han permitido demostrar que las proteínas codificadas por los PCVs interactúan con las células blanco para subvertir procesos celulares que les permitan completar el ciclo de replicación y bloquear los mecanismos de defensa celular (Mankertz, 2012). En este sentido, Timmusk et al., 2006, identificaron dos proteínas celulares que interactúan con la proteína Rep, una proteína filamentosa intermediaria similar a la proteína humana sincoilina y la proteína c-myc, una proteína reguladora de la transcripción celular. También se ha identificado la unión de Rep a tres proteínas porcinas homologas en humanos identificadas como ZNF265, TDG y VG5Q (Finsterbusch et al., 2009). El ZNF265 es un componente alternativo de un factor de espliceosoma conocido como SF2/ASF que se une al ARN mensajero para inducir empalme alternativo (Adams

et al., 2001). En el caso de la TDG, esta fue inicialmente descrita como una proteína de reparación del ADN (Neddermann et al., 1996), pero hoy se conoce que interactúa con un número de activadores de la transcripción y co-activadores como el CBP/p300 (Tini et al., 2002), con receptores de estrógenos alfa (Chen et al., 2003) y con el factor de transcripción tiroideo-1 TTF1 (Missero et al., 2001), lo que sugiere un papel regulador de la transcripción. Finalmente, VG5Q o AGGF codifica para un factor angiogénico pero su expresión es regulada por el factor de transcripción GATA1 (Fan et al., 2009).

También se ha reportado la unión de la proteína Cap a seis proteínas celulares (MKRN1, gC1qR, Par-4, NAP1, NPM1 y Hsp40) (Finsterbusch et al., 2009). En el caso de la glicoproteína del ORF3 (gpORF3) se demostró su interacción con pPirh2 (una ubiquitina E3 ligasa), compitiendo con esta para ligarse a p53 e inducir apoptosis (Liu et al., 2007). Otra proteína porcina que se une a gpORF3 del PCV2, es un regulador de la señalización de proteínas G (RGS) relacionada al RGS16 de humanos, la cual podría participar en la translocación de la gpORF3 en el núcleo (Timmusk et al., 2009).

Mediante las técnicas de espectrometría en masa 2-DE y MALDI-TOF (Zhang et al., 2009), se identificaron 34 proteínas diferencialmente expresadas en células PK15 infectadas con el PCV2. Se han encontrado variaciones importantes en las proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto (ACT18, ACTG1, ACTB, TUBA1A, KRT8), en la respuesta al estrés (HSP27), en la biosíntesis de macromoléculas (eEF2, ARPP0, RPA2, YARS2), en la biosíntesis y el procesamiento del ARN (PNP, BPM, HGPRT, HINT5), en proteínas metabólicas (TALDO, PDHB, GALM, PPID, IDH3A, ENO1, 6PGL, SGPA, PAPSS1, PPP2R2A, IDA, PRDX4), en proteínas de la vía ubiquitina-proteasoma (MOV40, PSMB3, PSME1, SGT1), en la transducción de señales (NUP43, RAP2C, NCK1) y en la regulación de genes (PHB).

En otro estudio proteómico realizado recientemente en ganglios linfáticos de

lechones obtenidos por cesárea, privados de calostro e infectados con el PCV2, se identificaron 50-75 proteínas expresadas en forma diferencial, las cuales están involucradas en diferentes procesos celulares como el transporte molecular, la regulación del ciclo celular, la transducción de señales, la homeostasis del hierro, la proliferación celular y apoptosis. Las vías más afectadas fueron la señalización de la respuesta al estrés oxidativo mediada por la proteína NRF-2 y la endocitosis mediada por caveolina (Ramirez-Boo et al., 2011).

Por otro lado, debido a la infección por el PCV2, se ha demostrado un aumento en la expresión de genes porcinos relacionados con: (i) el receptor para la motilidad mediada por hialuronato (RHAMM) (Bratanich and Blanchetot, 2006), (ii) el factor de empalme del ARN SPF30, esencial para el ensamblaje de las ribonucleoproteínas en el espliceosoma, (iii) una ARN helicasa, (iv) una proteína de membrana periférica (PACSIN2/Syndapin2) involucrada en la morfogénesis caveolar (Hansen et al, 2011) (v) y la enzima mitocondrial Quinurenina 3-Monooxigenasa (Mankertz, 2012).

1.13 Diagnóstico

La sola presencia de animales con pérdida de peso o signos respiratorios en las etapas de precebo-levante y la observación de lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad no son suficientes para confirmar un diagnóstico de circovirus porcina, por tal motivo el diagnóstico confirmatorio se basa en el hallazgo de criterios clínicos, patológicos y virológicos (Sorden, 2000; Segalés et al, 2005 a).

El diagnóstico individual incluye la presentación de los signos clínicos, los hallazgos de lesiones histopatológicas características y la identificación del PCV2 mediante pruebas de inmunohistoquímica (IHC) o hibridación *in-situ* (ISH) (Segales et al., 2003). Para el diagnóstico a nivel de granja se recomienda tener en cuenta el incremento igual o mayor al promedio más 1,66 desviaciones

estándar o que exceda el 50% de la mortalidad del promedio regional en el periodo evaluado (2-3 meses), la presencia de signos clínicos, la identificación de lesiones en al menos uno de cinco animales seleccionados para el diagnóstico, la evidencia de lesiones histopatológicas y la detección del antígeno relacionado con las lesiones (Allan et al., 2006).

Como se trata de una enfermedad multifactorial en la cual además del virus, participan otros factores externos e internos que determinan la ocurrencia de PCVAD (Opriessnig et al., 2007), es necesario establecer un diagnóstico diferencial para cada una de las condiciones clínicas relacionadas con el PCV2. Por otro lado, desde el punto de vista del laboratorio es relativamente sencillo detectar la infección subclínica mediante la demostración del antígeno o anticuerpos, pero debido a la naturaleza ubicua del agente y la manifestación subclínica de la enfermedad, estas observaciones deben ser contrastadas con los datos de campo para la correcta interpretación de los resultados de laboratorio (Segales et al., 2012).

1.14 Caracterización genotípica del PCV2

El PCV-2 puede ser categorizado en diferentes genotipos según el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*) de su genoma, siendo una herramienta útil para la caracterización de los distintos aislados de virus. En el 2002, se describió un ensayo PCR-RFLP utilizando la enzima NcoI que permite diferenciar rápidamente el PCV1 del PCV2 (Fenaux et al., 2000). En otro trabajo de investigación con el gen ORF2 del PCV2 y utilizando las enzimas *HinfI*, *HinP1I*, *KpnI*, *MseI*, y *RsaI*, se describieron cinco patrones de corte: A, B, C, D, y E (Hamel et al., 2000). Por su parte, Wen et al., 2005, utilizando las endonucleasas *Sau3AI*, *BanII*, *NspI*, *XbaI*, y *CfrI*, reportaron nueve genotipos (A-I) en muestras de diferentes regiones geográficas en China. Y en Ontario (Canadá), se demostró que la variación del RFL tipo 422 al tipo 321 en el 2005

estuvo relacionada con brotes de enfermedad (Delay et al., 2005).

En otro estudio realizado en el Japón, se analizaron muestras obtenidas en 10 granjas comerciales mediante un ensayo RFLP con el ORF2 empleando las enzimas de restricción *Avall*, *Bam*HI y *Clal* pudiéndose discriminar en el grupo 1 el RFLP tipo 111 y en el grupo 2 los RFLP 122, 122,222, 311 y 321 (Takahagi et al., 2008). Debido a que los grupos de investigación han utilizado diferentes enzimas es difícil obtener conclusiones comparativas entre los estudios con ensayos RFLP publicados.

Por su parte, el análisis filogenético de las secuencias del PCV2 origina distintos tipos de árboles filogenéticos dependiendo del fragmento usado para la comparación. Al analizar el segmento rep (ORF1) este se mantiene invariable entre los distintos grupos, mientras que al comparar el segmento cap (ORF2), se revelan diferencias entre los grupos, sugiriendo la posibilidad de recombinación genómica entre distintos genotipos de PCV2 (Cságola y col., 2005). La diferencia genética entre aislamientos del PCV2 se debe principalmente a la variabilidad del ORF2 (90.1 -100% de identidad a nivel de aminoácidos). La caracterización molecular de los aislados se basa en el análisis del genoma completo del PCV2 o la secuencia del gen ORF2. Esta última región es considerada como un marcador filogenético fiable para la caracterización molecular de las cepas PCV2 ya que es posible reconstruir el mismo árbol que con todo el genoma viral (Olvera et al., 2007).

Con el análisis de las secuencias del PCV2, ha sido posible caracterizar la información genética y comparar aislamientos de diferentes países y continentes (Ciacci-Zanella et al., 2009; Choi et al., 2002; de Boisseson et al., 2004; Grierson et al., 2004; Kim et al., 2002; Pérez et al., 2010; Ramos et al., 2012; Timmusk et al., 2008; Wiederkehr et al., 2009). Estos estudios filogenéticos y filogeográficos se han convertido en importantes estrategias para el estudio epidemiológico de las enfermedades asociadas al PCV2. Actualmente, se dispone de numerosas

secuencias del PCV2 publicadas en el Gen Bank, cuyo análisis ha permitido dilucidar la evolución viral y establecer el patrón de su dispersión dentro de un marco histórico, geográfico y teniendo en cuenta el comercio mundial. (Vidigal et al., 2012). Sin embargo, establecer la virulencia de las cepa con base en la información de las secuencia aún no es posible.

1.15 PCV2 e infecciones reproductivas

El primer caso de falla reproductiva asociado al PCV2, fue descrito en una granja nueva conformada por cerdas primerizas donde se presentaba abortos tardíos, incremento en la incidencia de mortinatos y momias. No se observó otros signos clínicos y tampoco se demostró la asociación con otros agentes infecciosos relacionados con problemas reproductivos en cerdas como el virus del PRRS, el parvovirus porcino (PVP) o *Leptospira interrogans* (West et al., en 1999).

Posteriormente, otros estudios relacionaron la presencia de momias, mortinatos y alta mortalidad neonatal (Brunborg et al., 2007) con la infección del PCV2 en casos de campo, semejante a lo observado en casos de parvovirus porcina (Mengeling, 2006).

1.16 Infección de las cerdas

Debido a la distribución global y la naturaleza ubicua del virus en la población porcina, la mayoría de las cerdas del pie de cría y las cerdas de reemplazo están expuestas al PCV2 antes del servicio y aunque podría esperarse que están al menos parcialmente protegidas, los problemas reproductivos asociados al PCV2 típicamente se reportan en poblaciones porcinas seronegativas como granjas de primerizas o nuevas explotaciones (Josephson and Charbonneau, 2001; O'Connor et al., 2001; Pittman, 2008; West et al., 1999). Sin embargo, también hay reportes de fallas reproductivas en piaras seropositivas, en cerdas de diferentes partos y en estudios experimentales realizados con cerdas

seropositivas (Janke, 2000; Nielsen et al., 2004).

Por otro lado, observaciones experimentales sugieren que la infección de las cerdas puede asociarse con retorno al estro debido a la muerte embrionaria causada por la replicación viral (Mateusen et al., 2007). Pero el efecto de la infección subclínica de las cerdas (Calsamiglia et al, 2007; Rodríguez-Arriola et al, 2002;.. Shen et al, 2010) y los reproductores (Larochelle et al, 2000; Madson et al, 2008; McIntosh et al., 2006) sobre la camada no se conoce completamente.

La infección subclínica de las cerdas es más común que las fallas reproductivas, por lo general no presentan signos de infección y al parto usualmente son seropositivas pero no necesariamente viremicas. Este tipo de infección se asocia con aumento en el número de fetos no viables (momias y mortinatos) en el parto (Madson and Opriessnig., 2011).

1.17 Infección en fetos y lechones

La infección de la cerda gestante o la inseminación de cerdas negativas con semen contaminado por el PCV2 puede conducir a la infección fetal (Madson et al., 2009; Park et al., 2005). La infección de la cerda gestante dura varias semanas y por lo tanto el virus puede afectar los fetos en diferentes etapas de la gestación (Mateusen et al., 2007; Park et al., 2005; Sánchez et al., 2001) y puede propagarse de feto a feto dentro del útero (Yoon et al., 2004).

El tiempo de la infección *in útero* por el PCV2 determina las diferencias en las lesiones y distribución viral en los tejidos. Un estudio de transferencia de embriones expuestos al PCV2 en cerdas receptoras seropositivas demostró que la replicación viral en embriones antes de los 21 días de preñez, puede causar la muerte de una alta proporción de embriones (Mateusen et al., 2007). En otro experimento, la infección intrauterina de fetos en cerdas con 57, 75 y 92 días de preñez (Sánchez et al., 2001) reportó que después de 21 dpi, la replicación del virus fue significativamente mayor en los fetos inoculados a los 57 días en

comparación con aquellos infectados a los 75 y 92 días de gestación.

Se ha demostrado que el miocardio es el principal sitio de replicación del PCV2 en los fetos durante el primero y segundo tercio de gestación (Sánchez et al., 2001) y al parecer hay una fuerte correlación entre el nivel de replicación viral y la severidad de las lesiones histopatológicas (O'Connor et al., 2001; Sanchez et al., 2003; Yoon et al., 2004; Brunborg et al., 2007; Rose et al., 2007). Por otro lado, si la infección viral se produce a finales de gestación, se detecta más antígeno o ADN en los tejidos linfoides sugiriendo un cambio en el tropismo celular (Sánchez et al., 2003). Los fetos expuestos en forma primaria al virus en la fase de inmunocompetencia fetal (después de los 70 días de gestación) pueden eliminar la infección viral antes del parto o pueden nacer viremicos con mínimas lesiones macroscópicas y microscópicas (Madson et al., 2009).

El papel de la infección fetal en la progresión de la infección en la vida postnatal también ha sido evaluado. El seguimiento de lechones nacidos vivos expuestos al PCV2 in útero durante 63 días (Ha et al., 2008), demostró que la infección prenatal con PCV2 por sí solo no induce la manifestación del PMWS en el periodo postnatal. Sin embargo, la infección postnatal con el parvovirus porcino o el uso de un agente inmunoestimulante (KLH) indujo la progresión de la infección prenatal por PCV2 al PMWS en el periodo postnatal. Estos resultados sugieren que los cerdos infectados con el PCV2 en el útero son más susceptibles a las coinfecciones con otros patógenos y por lo tanto estos podrían desarrollar clínicamente la enfermedad en la fase de crecimiento.

1.18 Inmunidad protectora frente al PCV2

Actualmente se considera que la eliminación de la infección viral está mediada por la combinación de anticuerpos neutralizantes (AN) y la respuesta mediada por células (Fort et al., 2009). En un estudio longitudinal de la respuesta inmune en lechones de ocho semanas obtenidos por cesárea y privados de calostro se

detectó por inmunofluorescencia indirecta (IFA) anticuerpos totales a partir de los 14 dpi, los AN fueron detectados hasta los 28 dpi (Pogranichnyy et al., 2000). En la prueba de seroneutralización desarrollada por Meerts et al., 2005; se detectaron anticuerpos a partir de los 10 dpi.

Por otro lado, en estudios de infección experimental se observó que los animales con mayores niveles de AN e interferón gamma (IFN- γ) tenían niveles más bajos de replicación viral, mientras que los cerdos que presentaban una respuesta débil o nula de AN e IFN- γ exhibían cargas más altas de replicación viral indicando que la multiplicación del PCV2 se correlaciona con la existencia de diferentes patrones de respuesta adaptativa a la infección (Meerts et al., 2005). Estos mismos autores reportaron posteriormente diferencias en el desarrollo de la respuesta inmune humoral entre cerdos subclínicamente infectados y animales enfermos. Los títulos de IgG1, IgG2 e IgA fueron significativamente más bajos en cerdos con signos clínicos comparados con los encontrados en animales sanos, indicando que la ausencia de anticuerpos se correlaciona con la replicación del virus y la expresión clínica del PMWS (Meerts et al., 2006). De forma similar, al comparar casos naturales de PMWS y cerdos con infección subclínica, se observó que los animales afectados clínicamente mostraron un deterioro en la respuesta inmune humoral (Fort et al., 2007).

La activación de la inmunidad celular, incluyendo la producción de IFN- γ es necesaria para el control de la infección por el PCV2. En la infección de lechones SPF únicamente con PCV2 o en combinación con PPV, no se observaron manifestaciones clínicas de enfermedad en ninguno de los dos casos pero se pudo determinar que la infección inducía la producción de células secretoras de IFN- γ y los análisis con anticuerpos mostraron que esta respuesta involucraba células CD4+ y CD8+ (Steiner, et al., 2009).

En otro estudio se demostró que la infección por el PCV2 inducía la secreción de interleuquina 10 (IL-10) en células monocíticas lo cual podría conducir a la

supresión de la respuesta de células T (Kekarainen et al., 2008). Un incremento en los niveles de ARN mensajero (mARN) en el timo de cerdos clínicamente afectados por PMWS se asoció con la inmunosupresión de células T (Darwich et al., 2003). También se ha reportado niveles elevados de IL-10 en cerdos clínicamente enfermos (Stevenson et al., 2006) y en animales con viremia prolongada (Fort et al., 2009a). En términos generales, hasta el momento no se puede explicar el por qué, algunos cerdos son capaces de eliminar de manera eficiente la infección por el PCV2, mientras que otros no logran montar una respuesta inmune efectiva.

Cuando se evaluó la inmunidad pasiva frente al PCV2 se demostró que esta puede proteger a los lechones al menos parcialmente. En un estudio experimental (McKeown et al, 2005) realizado en lechones comerciales con diferentes títulos de anticuerpos maternos (ELISA), se observó luego del desafío que los lechones con mayores niveles de anticuerpos maternos mostraron menor carga viral en comparación con los niveles de viremia detectados en lechones con bajos títulos de anticuerpos maternos. Por lo tanto, se dedujo que la protección conferida por inmunidad pasiva es dependiente de los títulos de anticuerpos maternos.

Por otro lado, en la infección experimental de lechones convencionales de tres semanas de edad con un aislado de PCV2 en combinación con PPV, se demostró que la inmunidad pasiva pueden desempeñar un papel en la prevención del desarrollo de PMWS, pero no es capaz de prevenir las infecciones subclínicas por el PCV2. Además se observó que la difusión y persistencia del virus en los tejidos puede depender del nivel de anticuerpos en el momento de la infección (Ostanello et al., 2005).

Referencias

- Adams, D.J., van der Weyden, L., Mayeda, A., Stamm, S., Morris, B.J., Rasko, J.E., 2001. ZNF265 – a novel spliceosomal protein able to induce alternative splicing. *J. Cell Biol.* 154 (1), 25–32.
- Allan G., McNeilly F. PMWS/PCVD.2006. Diagnosis, disease and control: what do we know? Proceedings of the 19th IPVS congress 1, 1-9
- Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A.C., Adair, B.M., Ellis, W.A., McNulty, M.S., 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.* 44, 49–64
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E.D., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998a. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the United States of America and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 3 - 10.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999a. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121 (1), 1–11.
- Bolin, S.R., Stoffregen, W.C., Nayar, G.P., Hamel, A.L., 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13 (3), 185–194.
- Belyi, V.A., Levine, A.J., Skalka, A.M., 2010. Sequences from ancestral single-stranded DNA viruses in vertebrate genomes: the parvoviridae and circoviridae are more than 40 to 50 million years old. *J. Virol.* (84), 12458–12462.
- Blinkova, O., Victoria, J., Li, Y., Keele, B.F., Sanz, C., Ndjanga, J.B., Peeters, M., Travis, D., Lonsdorf, E.V., Wilson, M.L., Pusey, A.E., Hahn, B.H., Delwart, E.L., 2010. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. *J. Gen. Virol.* 91 (Pt 1), 74–86.

Bratanich, A., Blanchetot, A., 2006. A gene similar to the human hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) gene is upregulated during Porcine Circovirus type 2 infection. *Virus Genes* 32 (2), 145–152.

Brunborg, I.M., Jonassen, C.M., Moldal, T., Bratberg, B., Lium, B., Koenen, F., Schonheit, J., 2007. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19 (4), 368–375.

Cadar D, Cságola A, Lorincz M, Tombácz K, Spînu M, Tuboly T., 2012. Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infect Genet Evol.* 12(2), 420–427

Cai, L., Han, X., Ni, J., Yu, X., Zhou, Z., Zhai, X., Chen, X., Tian, K., 2011. Natural recombinants derived from different patterns of recombination between two PCV2b parental strains. *Virus Res.* 158 (1–2), 281–288.

Calsamiglia, M., Fraile, L., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Mateu, E., Domingo, M., Segalés, J., 2007. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res. Vet. Sci.* 82 (3), 299–304.

Carman, S., Cai, H.Y., DeLay, J., Youssef, S.A., McEwen, B.J., Gagnon, C.A., Tremblay, D., Hazlett, M., Lusi, P., Fairles, J., Alexander, H.S., van Dreumel, T., 2008. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease – 2004–2006. *Can. J. Vet. Res.* 72 (3), 259–266

Chae, C., 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet. J.* 169 (3), 326–336.

Chen, D., Lucey, M.J., Phoenix, F., Lopez-Garcia, J., Hart, S.M., Losson, R., Buluwela, L., Coombes, R.C., Chambon, P., Schar, P., Ali, S., 2003. T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase potentiates transcription of estrogen-regulated genes through direct

interaction with estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 278 (40), 38586–38592

Cheung, A.K., 2003. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virol* 305, 168–180.

Cheung, A.K., 2004c. Identification of the essential and non-essential transcription units for protein synthesis, DNA replication and infectious virus production of Porcine circovirus type 1. *Arch. Virol.* 149 (5), 975–988.

Cheung, A.K., 2007. A stem-loop structure, sequence non-specific, at the origin of DNA replication of porcine circovirus is essential for termination but not for initiation of rolling-circle DNA replication. *Virol* 363 (1), 229–235.

Cheung, A.K., 2009. Homologous recombination within the capsid gene of porcine circovirus type 2 subgroup viruses via natural co-infection. *Arch. Virol.* 154 (3), 531–534

Cheung A. K., 2012. Porcine circovirus: transcription and DNA replication. *Virus Res.* 164 (1-2), 46-53

Cheung, A.K., Greenlee, J.J., 2011. Identification of an amino acid domain encoded by the capsid gene of porcine circovirus type 2 that modulates intracellular viral protein distribution during replication. *Virus Res.* 155 (1), 358–362.

Cheung, A.K., Lager, K.M., Kohutyuk, O.I., Vincent, A.L., Henry, S.C., Baker, R.B., Rowland, R.R., Dunham, A.G., 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch. Virol.* 152 (5), 1035–1044.

Choi J, Stevenson GW, Kiupel M, et al.: 2002, Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 66, 217–224.

Ciacchi-Zanella J.R., Simon N.L., Pinto L. S. Viancelli A., Teixeira L., Hayashi M., Dellagostin O.A., Esteves P.A., 2009. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2)

variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Res. Vet. Sc.* 87 (1), 157–160.

Cino-Ozuna, A.G., Henry, S., Hesse, R., Nietfeld, J.C., Bai, J., Scott, H.M., Rowland, R.R., 2011. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. *J. Clin. Microbiol.* 49 (5), 5.

Clark, E.G., 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proc. West. Can. Assoc. Swine Pract.*, pp. 19–20.

Clark, E.G., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. Am. Ass. Swine Prac.*, pp. 499-501.

Correa, A.M., Zlotowski, P., de Barcellos, D.E., da Cruz, C.E., Driemeier, D., 2007. Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19 (1), 109–112

Castro, A.M.M.G., Cortez, A., Heinemann, M.B., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2007. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). *Arch. Virol.* 152 (8), 1435–1445.

Cortey, M., Olvera, A., Grau-Roma, L., Segalés, J., 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet. Microbiol.* 149 (3–4), 522–523.

Csagola, A., Kecskemeti, S., Kardos, G., Kiss, I., Tuboly, T., 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch. Virol.* 151, 495–507.

Darwich, L., Pie, S., Rovira, A., Segales, J., Domingo, M., Oswald, I.P., Mateu, E., 2003. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt8), 2117–2125.

De Boissésou, C., Béven, V., Bigarré, L., Thiéry, R., Rose, N., Eveno, E., Madec, F., Jestin, A., 2004. Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-

weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J. Gen. Virol.* 85, 293–304.

Delay J, McEwen B, Carman S, van Dreuel T, Fairles J: Porcine circovirus type 2-associated disease is increasing. *AHL Newsletter.* 9:22, 2005

del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (2), 434–464.

Delwart E, Li L., 2011. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Res.* 164(1-2), 114-121

Donson, J., Morris-Krsinich, B.A., Mullineaux, P.M., Boulton, M.I., Davies, J.W., 1984. A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion-associated. *EMBO J.* 3 (13), 3069–3073

Drolet, R., Thibault, S., D'Allaire, S., Thomson, J.R., Done, S.H., 1999. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *J. Swine Health Prod.* 7, 283–285

Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case–control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* 128 (1–2), 56–64

Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39, 44-51

Ellis, J.A., Harding, J., Gagnon, C.A., Hamel, A., 2006. Porcine circovirus disease in Canada. A circle within a wheel. PCVD.Coming full circle.In: 19th IPVS. Copenhagen, Denmark p, 23–34.

Fan, C., Ouyang, P., Timur, A.A., He, P., You, S.A., Hu, Y., Ke, T., Driscoll, D.J., Chen, Q., Wang, Q.K., 2009. Novel roles of GATA1 in regulation of angiogenic factor AGGF1 and endothelial cell function. *J. Biol. Chem.* 284 (35), 23331–23343.

Fauquet, C.M., Fargette, D., 2005. International committee on taxonomy of viruses and the 3,142 unassigned species. *Viol. J.* 2, 64.

Fenaux, M., Halbur, P.G., Gill, M., Toth, T.E., Meng, X.J., 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.* 38 (7), 2494–2503.

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J. Virol.* 78 (24), 13440–13446.

Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Meng XJ, 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol* 77, 11232–11243.

Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Caliskan, R., Mankertz, A., 2005. Analysis of the sub-cellular localization of the proteins Rep, Rep₂ and Cap of porcine circovirus type 1. *Viol.* 343 (1), 36–46

Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Doberstein, K., Rodner, C., Mankertz, A., 2009. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins. *Viol.* 386(1), 122–131

Fort, M., Fernandes, L.T., Nofrarias, M., Diaz, I., Sibila, M., Pujols, J., Mateu, E., Segales, J., 2009a. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129 (1–2), 101–107.

Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet. Microbiol.* 125 (3–4), 244–255.

Gagnon CA, Music N, Fontaine G, Tremblay D, Harel J., 2010. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol.* 144(1-2), 18-23.

Ge, X., Li, J., Peng, C., Wu, L., Yang, X., Wu, Y., Zhang, Y., Shi, Z., 2011. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *J. Gen. Virol.* 92, 2646–2653.

Gerber PF, Garrocho FM, Lana AM, Lobato ZI., 2011. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Vet J.* 188(2), 240-242.

Gibbs, M.J., Weiller, G.F., 1999. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (96), 8022– 8027.

Graham, F.L., Rudy, J., Brinkley, P., 1989. Infectious circular DNA of human adenovirus type 5: regeneration of viral DNA termini from molecules lacking terminal sequences. *EMBO J.* 8 (7), 2077–2085.

Grau-Roma, L., Segalés, J., 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet. Microbiol.* 119 (2–4), 144–151.

Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., López-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segalés, J., 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 128 (1–2), 23–35.

Grierson SS, King DP, Wellenberg GJ, Banks M: 2004. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res Vet Sci* 77, 265–268.

Guo LJ, Lu YH, Huang LP, Wei YW, Wu HL, Liu CM, 2011. First construction of infectious clone for newly emerging mutation porcine circovirus type 2 (PCV2) followed by comparison with PCV2a and PCV2b genotypes in biological characteristics in vitro. *Virol J.* 8, 291

Guo, L.J., Lu, Y.H., Wei, Y.W., Huang, L.P., Liu, C.M., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol. J.* 7, 273.

Gutierrez, C., 1999. Geminivirus DNA replication. *Cell Mol. Life Sci.* 56 (3-4), 313–329.

Ha, Y., Ahn, K.K., Kim, B., Cho, K.-D., Lee, B.H., Oh, Y.-S., Kim, S.-H., Chae, C., 2009a. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. *Res. Vet. Sci.* 86 (1), 108–110.

Ha, Y., Lee, Y.H., Ahn, K.K., Kim, B., Chae, C., 2008. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Vet. Pathol.* 45 (6), 842–848.

Hafner, G.J., Harding, R.M., Dale, J.L., 1997. A DNA primer associated with banana bunchy top virus. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 2), 479–486.

Hansen, C.G., Howard, G., Nichols, B.J., 2011. Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *J. Cell Sci.* 124 (Pt 16), 2777–2785.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P.S., 1998. Nucleotide sequence of porcine circoviruses associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72, 5262 - 5267.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Sachvie, C., Grudeski, E., Nayar, G.P., 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Res.* 64 (1), 44–52.

Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., Robertson, D., 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35 (2), 105–140

Harding, J.C., 1996. Postweaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. In: *Proc. West. Can. Assoc. Swine Pract*, p. 21.

Harding, J.C., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome PMWS: Preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, p503

Harding, J.C., 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet. Microbiol.* 98 (2), 131–135.

Harding, J.C., Clark, E.G., 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Swine Health Prod.* 5, 201–203.

Harding, J.C.S., Ellis, J.A., McIntosh, K.A., Krakowka, S., 2010. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs. *Vet. Microbiol.* 145 (3–4), 209–219.

Harms, P.A., Halbur, P.G., Sorden, S.D., 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Swine Health Prod.* 10 (1), 4.

Heath, L., Martin, D. P., Warburton, L., Perrin, M., Horsfield, W., Kingsley, C., Rybicki, E. P. & Williamson, A. L. 2004. Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in southern Africa. *J Virol.* 78, 9277–9284.

Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R.R., 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res.* 132 (1–2), 201–207.

Hines RK, Lukert PD. 1994. Porcine circovirus as a cause of congenital tremors in newborn pigs. *Proc. Ame. Ass. Swine Pract.*, p, 344-345.

Hines, R.K., Lukert, P.D., 1995. Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States. *Swine Health Prod.* 3, 71–73.

Horlen, K.P., Dritz, S.S., Nietfeld, J.C., Henry, S.C., Hesse, R.A., Oberst, R., Hays, M., Anderson, J., Rowland, R.R., 2008. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232 (6), 906–912.

Horlen, K.P., Schneider, P., Anderson, J., Nietfeld, J.C., Henry, S.C., Tokach, L.M., Rowland, R.R., 2007. A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: clinical features and association with the PCV2b genotype. *J. Swine Health Prod.* 15 (5), 270–278.

Ilyina, T.V., Koonin, E.V., 1992. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eukaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res.* 20 (13), 3279–3285.

Janke BH: 2000, Case report: Porcine circovirus as a cause of reproductive problems. *Proc. Iowa Vet. Med.Ass.* Ames, Iowa 118:10

Johnson, C.S., Joo, H.S., Direksin, K., Yoon, K.J., Choi, Y.K., 2002. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14 (6), 507–512.

Josephson, G., Charbonneau, G., 2001. Case report of reproductive problem in a new startup operation. *Swine Health Prod.* 9, 258–259.

Juhan, N.M., LeRoith, T., Opriessnig, T., Meng, X.J., 2010. The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant. *Virus Res.* 147, 60-66.

Karuppannan, A.K., Jong, M.H., Lee, S.H., Zhu, Y., Selvaraj, M., Lau, J., Jia, Q., Kwang, J., 2009. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3

function. *Virol.* 383 (2), 338–347.

Karuppannan, A.K., Kwang, J., 2011. ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the virus. *Virol.* 410, 248–256

Katzourakis, A., Gifford, R.J., 2010. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet.* (6), e1001191.

Kekarainen, T., Montoya, M., Mateu, E., Segales, J., 2008. Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J. Gen. Virol.* 89 (Pt3), 760–765.

Khaiseb, S., Sydlar, T., Zimmermann, D., Pospischil, A., Sidler, X., Brugnera, E., 2011. Porcine circovirus 2 major genotype group members' co-replication as a prerequisite to co-evolution that may explain the variable disease manifestations. *J. Virol.* 85 (21), 11111–11120.

Khan, S.A., 2000. Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol. Microbiol.* 37 (3), 477–484.

Khayat, R., Brunn, N., Speir, J.A., Hardham, J.M., Ankenbauer, R. G., Schneemann, A., Johnson J.E., 2011. The 2.3-Angstrom Structure of Porcine Circovirus 2. *J. Virol.* 85 (15), 7856–7862

Kim, J., Chung, H.K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet. J.* 166 (3), 251–256.

Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Chae, C., 2004. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 68 (3), 218–221.

Kim, H.K., Luo, Y., Moon, H.J., Park, S.J., Keum, H.O., Rho, S., Park, B.K., 2009. Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2 isolated in Korea. *Virus Genes* 39 (3), 352–358.

Kim, J.H., Lyoo YS: 2002, Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. *J Vet Sci.* 3, 31–39.

Kixmoller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmuller, A., Elbers, K., Fachinger, V., 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26 (27–28), 3443–3451.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17 (12), 1244–1245.

Larochelle, R., Bielanski, A., Müller, P., Magar, R., 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* 38 (12), 4629–4632

Larochelle, R., Magar, M., D'Allaire, S., 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res.* 90, 101–112.

LeCann, P., Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., Jestin, A., 1997. Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 141, 660.

Lefebvre, D.J., Costers, S., Van Doorselaere, J., Misinzo, G., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Antigenic differences among porcine circovirus type 2 strains, as demonstrated by the use of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 89, 177–187

Lefebvre, D.J., Meerts, P., Costers, S., Misinzo, G., Barbé, F., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., 2008b. Increased porcine circovirus type 2 replication in porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation. *Vet. Microbiol.* 25, 74–86.

Lefebvre, D.J., Van Doorselaere, J., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2009. Recombination of two porcine circovirus type 2 strains. *Arch. Virol.* 154 (5), 875–879.

Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumniyom, N., Wajjawalku, W., Meng, X.J., 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J. Virol.* 78 (15), 8135–8145.

Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wil-

son, M.L., Ndjango, J.B., Peeters, M., Gross-Camp, N.D., Muller, M.N., Hahn, B.H., Wolfe, N.D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2010. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J. Virol.* 84 (4), 1674–1682.

Lin, W.L., Chien, M.S., Du, Y.W., Wu, P.C., Huang, C., 2009. The N-terminus of porcine circovirus type 2 replication protein is required for nuclear localization and ori binding activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (4), 1066–1071.

Liu, H., Fu, Y., Li, B., Yu, X., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X., Jiang, D., 2011. Widespread horizontal gene transfer from circular single-stranded DNA viruses to eukaryotic genomes. *BMC Evol. Biol.* (11), 276.

Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 80, 5065–5073.

Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 79 (13), 8262–8274.

Liu, J., Zhu, Y., Chen, I., Lau, J., He, F., Lau, A., Wang, Z., Karuppanan, A.K., Kwang, J., 2007. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J. Virol.* 81 (17), 9560–9567.

Lukert P, de Boer GF, Dale JL, et al.: 1995. The Circoviridae. In: Virus taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, et al., pp. 166–168. Springer-Verlag, Vienna and New York.

Ma, C.M., Hon, C.C., Lam, T.-Y., Li, V.Y.-Y., Wong, C.K. W., de Oliveira, T., Leung, F.C. C., 2007. Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. *J. Gen. Virol.* 88 (Pt 6), 1733–1737

Ma H, Shaheduzzaman S, Williams DK, Gao Y, Khan AS, 2011 Investigations of porcine circovirus type 1 (PCV1) in vaccine-related and other cell lines. *Vaccine* 29, 8429–8437

Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahé, D., Albina, E., Jestin, A., 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest. Prod. Sci.* 63, 223–233.

Madson, D.M., Opriessnig, T. PCV2-associated reproductive failure. 2011. *Proc. Ame. Ass. Swine Vet. Annual Meeting*, p. 427.432

Madson, D.M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J., Opriessnig T., 2009. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 46, 707–716.

Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, et al.: 2009, Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of the dam on PCV2 replication in utero. *Clin Vaccine Immunol* 16, 830–834.

Madson, D.M., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X.-J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2008. Characterization of shedding patterns of porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20 (6), 725–734.

Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., Jestin, A., 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 7), 1815–1824.

Magar, R., Muller, P., Larochelle, R., 2000. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can. J. Vet. Res.* 64 (3), 184–186.

Mankertz, A., 2012. Molecular interactions of porcine circoviruses type 1 and type 2 with its host. *Virus Res.* 164(1-2), 54-60.

Mankertz, J., Buhk, H.J., Blaess, G., Mankertz, A., 1998. Transcription analysis of porcine

circovirus (PCV). *Virus Genes* 16 (3), 267–276.

Mankertz A, Domingo M, Folch JM, LeCann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Plana-Durán J, Soike D, 2000. Characterization of PCV2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 66, 65-77.

Mankertz, A., Hillenbrand, B., 2002. Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. *J. Gen. Virol.* 83 (11), 2743–2751.

Mateusen, B., Maes, D.G., Van Soom, A., Lefebvre, D., Nauwynck, H.J., 2007. Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenol.* 68 (6), 896–901.

Mateusen, B., Sanchez, R.E., Van Soom, A., Meerts, P., Maes, D.G.D., Nauwynck, H.J., 2004. Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection. *Theriogenol.* 61, 91–101.

McIntosh, K.A., Harding, J.C.S., Parker, S., Ellis, J.A., Appleyard, G.D., 2006. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18 (4), 380–384.

McKeown, N.E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D.K., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (11), 1347–1351.

Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterisation of novel circoviruses associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79, 2171-2179.

Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Botner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet. Res.* 2, 6

Meerts, P., Misinzo, G., McNeilly, F., Nauwynck, H.J., 2005a. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch. Virol.* 150, 427–441.

Meerts, P., Misinzo, G., Nauwynck, H.J., 2005b. Enhancement of porcine circovirus 2 replication in porcine cell lines by interferon-gamma pre- and post-treatment and by IFN-alpha post-treatment. *J. Interf. Cytok. Res.* 25, 684–693

Meerts, P., Van Gucht, S., Cox, E., Vandebosch, A., Nauwynck, H.J., 2005. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Virol Immunol.* 18 (2), 333–341.

Mengeling, W.L., 2006. Porcine parvovirus. In: *Diseases of Swine*, 9th edition, p. 13.

Misinzo, G., Delputte, P., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Nauwynck, H., 2006. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J. Virol.* 80, 3487–3494.

Misinzo, G., Delputte, P., Nauwynck, H.J., 2008a. Inhibition of endosomal-lysosomal system acidification enhances porcine circovirus 2 infection of porcine epithelial cells. *J. Virol.* 82, 1128–1135.

Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M., Nauwynck, H., 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J. Gen. Virol.* 86, 2057–2068

Missero, C., Pirro, M.T., Simeone, S., Pischetola, M., Di Lauro, R., 2001. The DNA glycosylase T:G mismatch-specific thymine DNA glycosylase represses thyroid transcription factor-1-activated transcription. *J. Biol. Chem.* 276 (36), 33569–33575

Musatov, S.A., Scully, T.A., Dudus, L., Fisher, K.J., 2000. Induction of circular episomes during rescue and replication of adeno-associated virus in experimental models of virus latency. *Virol* 275 (2), 411–432.

Nauwynck HJ, Sanchez R, Meerts P, Lefebvre DJ, Saha D, Huang L, Misinzo G, 2012. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Res.* 164(1-2), 43-5

Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81, 2281-2287.

Neddermann, P., Gallinari, P., Lettieri, T., Schmid, D., Truong, O., Hsuan, J.J., Wiebauer, K., Jiricny, J., 1996. Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 271 (22), 12767–12774.

Nielsen J, Ladekjær-Hansen AS, Bille-Hansen V, et al.: 2004. PCV2- associated disease following intrauterine infection. *Proc 18th International Pig Veterinary Society Congress* 1:14-

Novick, R.P., 1998. Contrasting lifestyles of rolling-circle phages and plasmids. *Trends Biochem. Sci.* 23 (11), 434–438.

O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E.G., Konoby, C., Allan, G., Ellis, J.A., 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can. Vet. J.* 42 (7), 551–553.

Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Viol.* 357 (2), 175–185

Opriessnig, T., Janke, B.H., Halbur, P.G., 2006b. Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. *J. Comp. Pathol.* 134 (1), 105–110.

Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19 (6), 591–615.

Opriessnig, T., Ramamoorthy, S., Madson, D.M., Patterson, A.R., Pal, N., Carman, S.,

Meng, X.J., Halbur, P.G., 2008b. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J. Gen. Virol.* 89 (Pt 10), 2482–2491.

Ostanello, F., Caprioli, A., Di Francesco, A., Battilani, M., Sala, G., Sarli, G., Mandrioli, L., McNeilly, F., Allan, G.M., Prosperi, S., 2005. Experimental infection of 3-weekold conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 108 (3–4), 179–186.

Park, J.S., Ha, Y., Kwon, B., Cho, K.D., Lee, B.H., Chae, C., 2009. Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. *J. Comp. Pathol.* 140 (2–3), 208–211.

Park, J.S., Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Lim, J.K., Kim, S.H., Chae, C., 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J. Comp. Pathol.* 132 (2–3), 139–144.

Patterson, A.R., Madson, D.M., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2011b. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. *Vet. Microbiol.* 149 (1–2), 225–229.

Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Madson, D.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2011c. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Vet. Microbiol.* 149, 91–98.

Perez, L.J., Diaz de Arce, H. and Frias, M.T., 2010. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 strains present in Cuban swine herds. *Res. Vet. Sci.* 89 (2), 301–305.

Pittman JS., 2008. Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. *J Swine Health Prod.*; 16(3), 144–148.

Pogranichnyy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Sorden, S.D., 2000. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Virol Immunol.* 13 (2), 143–153.

Puvanendiran S, Stone S, Yu W, Johnson CR, Abrahante J, Jimenez LG, Griggs T, Haley C, Wagner B, Murtaugh MP, 2011. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Research* 157:92-98.

Quintana J, Segalés J, Calsamiglia M, Domingo M (2006) Detection of porcine circovirus type 1 in commercial pig vaccines using polymerase chain reaction. *Vet J* 171, 570–573

Ramos N, Mirazo S, Castro G, Arbiza J., 2012. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from piglets with exudative epidermitis in Uruguay. *Res Vet Sci.* 93(2), 1042-1045

Rodríguez-Arrioja, G.M., Segalés, J., Calsamiglia, M., Resendes, A.R., Balasch, M., Plana-Duran, J., Casal, J., Domingo, M., 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 63 (3), 354–357.

Rosell, C., Segalés, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodríguez-Arrioja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120 (1), 59–78.

Rosell, C., Segales, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodriguez-Arrioja, G.M., Duran, C.O., Balasch, M., Plana-Duran, J., Domingo, M., 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146, 40–43.

Royer, R.L., Nawagigul, P., Halbur, P.G., Paul, P.S., 2001. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *J Swine Health Prod.* 9(6), 281–284.

Saha, D., Lefebvre, D.J., Ducatelle, R., Doorselaere, J.V., Nauwynck, H.J., 2011. Outcome of experimental porcine circovirus type 1 infections in mid-gestational porcine fetuses. *Vet Res* 7, 64-72

Saha, D., Lefebvre, D., Van Doorselaere, J., Atanasova, K., Barbé, F., Geldhof, M., Karniychuk, U.U., Nauwynck, H.J., 2010. Pathological and virological outcome in mid-gestational porcine foetuses after experimental inoculation with PCV2a and PCV2b. *Vet. Microbiol.* 145, 62–68.

Sanchez, R.E., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet. Microbiol.* 95 (1–2), 15–25.

Sanchez, R., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2004. Characteristics of porcine circovirus 2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late-gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. *J. Vet. Diag. Invest.* 16, 168–178.

Sánchez Jr., R.E., Nauwynck, H.J., McNeilly, F., Allan, G.M., Pensaert, M.B., 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet. Microbiol.* 83 (2), 169–176.

Sanchez, R., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet. Microbiol.* 83, 169–176.

Saunders, K., Lucy, A., Stanley, J., 1992. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 20 (23), 6311–6315.

Sauvage, V., Cheval, J., Foulongne, V., Gouilh, M.A., Pariente, K., Manuguerra, J.C., Richardson, J., Dereure, O., Lecuit, M., Burguiere, A., Caro, V., Eloit, M., 2011. Identification of the first human gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. *J. Virol.* 85 (15), 7948–7950.

Schmoll, F., Lang, C., Steinrigl, A.S., Schulze, K., Kauffold, J., 2008. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenol.* 69 (7), 814–821.

Seeliger, F.A., Brugmann, M.L., Kruger, L., Greiser-Wilke, I., Verspohl, J., Segalés, J., Baumgartner, W., 2007. Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Vet. Pathol.* 44 (5), 621–634.

Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10– 19

Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005a. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6 (2), 119–142.

Segalés, J., Domingo, M., 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Q.* 24 (3), 109–124.

Segalés, J., Domingo, M., 2003. Diagnosis, prevention and control of PCV2-associated diseases. *Proc. Am. Ass. Vet. p.* 371–376

Segalés, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., Sibila, M., Badiella, L., Domingo, M., 2005. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 111, 223–229.

Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet. Rec.* 162 (26), 867–868

Segalés, J., Piella, J., Marco, E., Mateu-de-Antonio, E.M., Espuna, E., Domingo, M., 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet. Rec.* 142 (18), 483–486.

Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M., 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet. Microbiol.* 98 (2), 137–149.

Shang, S.B., Jin, Y.L., Jiang, X.T., Zhou, J.Y., Zhang, X., Xing, G., He, J.L., Yan, Y., 2009. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol. Immunol.* 46, 327–334.

Shen, H., Wang, C., Madson, D.M., Opriessnig, T., 2010. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Prev. Vet. Med.* 97 (3–4), 228–236.

Shibata, I., Okuda, Y., Kitajima, K., Asai, T., 2006. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *J. Vet. Med. B/Zentralbl. Vet. Med. Reihe B* 53 (6), 278–280.

Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y., Hidejima, I., 2003. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 405–408.

Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y., Hidejima, I., Smith, W.J., Thomson, J.R., Done, S., 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet. Rec.* 132, 47.

Sorden, S., 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Swine Health and Prod.* 8, 136.

Steiner, E., Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., McCullough, K., 2009. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet. Res.* 5, 45.

Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K., 2008. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology* 378, 311–322.

Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2001. Rep and Rep₂ protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* 291 (1), 152–160.

Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2006. Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep₂ proteins of porcine circovirus type 1. *J. Virol.* 80 (13), 6225–6234

Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2007. Functional analysis of cis- and trans-acting replication factors of porcine circovirus type 1. *J. Virol.* 81 (11), 5696–5704.

Stevenson, L.S., McCullough, K., Vincent, I., Gilpin, D.F., Summerfield, A., Nielsen, J., McNeilly, F., Adair, B.M., Allan, G.M., 2006. Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week old piglets. *Virol Immunol.* 19 (2), 189–195.

Szeredi, L., Szentirmai, C., 2008. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Vet. Hung.* 56 (1), 101–109.

Takahagi, Y., Nishiyama, Y., Toki, S., Yonekita, T., Morimatsu, F., Murakami, H., 2008. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Vet Med Sci.* 70(6), 603–606.

Timmusk, S., Fossum, C., Berg, M., 2006. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. *J. Gen. Virol.* 87 (Pt 11), 3215–3223.

Timmusk, S., Merlot, E., Lovgren, T., Jarvekulg, L., Berg, M., Fossum, C., 2009. Regulator of G protein signalling 16 is a target for a porcine circovirus type 2 protein. *J. Gen. Virol.* 90 (Pt 10), 2425–2436.

Timmusk, S., Wallgren, P., Brunborg, I.M., Wikström, F.H., Allan, G., Meehan, B., McMenamy, M., McNeilly, F., Fuxler, L., Belák, K., Pödersoo, D., Saar, T., Berg,

M., Fossum, C., 2008. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes* 36 (3), 509–520

Tini, M., Benecke, A., Um, S.J., Torchia, J., Evans, R.M., Chambon, P., 2002. Association

of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Mol. Cell* 9 (2), 265–277.

Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zbl.Bakt.* 226, 153-167.

Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S., Germann, B., 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 140 (8), 737–743.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch, MA., 1982. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64–66.

Tischer I, Mielsch W, Wolff D, Vagt M, Griem W, 1986. Studies on the pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91: 271-276.

Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96 (1–2), 39–57.

Tribble, B.R.; Rowland, R.R., 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res.* 164(1-2), 68-77.

Truong C, Mahe D, Blanchard P, Le Dimna M, Madec F, Jestin A, Albina E., 2002. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch Virol.* 146 (6), 1197-211.

Thrusfield, M., 1995. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell, Oxford, 483 pp

Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M.S., Jaing, C., McLoughlin, K., Gardner, S., Delwart, E.L., 2010. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J. Virol.* 84 (12), 6033–6040.

Vidigal, P.M., Mafra, C.L., Silva, F.M., Fietto, J.L., Silva, J.A., Almeida, M.R., 2012. Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for

determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. *Virus Res.* 163(1), 320-327

Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J. Virol.* 77, 13288–13300.

Wang, C., Pang, V.F., Jeng, C.R., Lee, F., Huang, Y.W., Lin, Y.L., Hsiao, S.H., Lai S., 2011. Detection of porcine circovirus type 1 in commercial porcine vaccines by loop-mediated isothermal amplification. *Folia Microbiol.* 56, 483–489

Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145 (1), 151–156.

Welch, J., Bienek, C., Gomperts, E., Simmonds, P., 2006. Resistance of porcine circovirus and chicken anemia virus to virus inactivation procedures used for blood products. *Transfusion.* 46(11), 1951-1958.

Wen, L., Guo, Yang, H. 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet Microbiol* 110, 141–146.

West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11 (6), 530–532.

Wiederkehr, D., Sydler, T., Brugnera, E., Buergi, E., Sidler, X., 2007. Different genotypes of porcine circovirus type 2 in immunohistologically positive Swiss pigs from 1986 to 2005. PMWS, PRRS, swine influenza and associated diseases. In: Fifth International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Krakow, Poland, p. 84

Wiederkehr, D.D., Sydler, T., Buergi, E., Haessig, M., Zimmermann, D., Pospischil, A., Brugnera, E., Sidler, X., 2009. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Vet Microbiol.* 14;136 (1-2):27-35.

Yoon, K.J, Jepsen, R.J, Pogranichniy, R.M, Sorden, S., Stammer, R., Evans, L., 2004. A novel approach to intrauterine viral inoculation of swine using PCV type 2 as a model. *Theriogenol.* 61, 1025–1037.

Young, M.G., Cunningham, G.L., Sanford, S.E., 2011. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J. Swine Health Prod.* 19, 6.

Zhai, S.L., Chen, S.N., Wei, Z.Z., Zhang, J.W., Huang, L., Lin, T., Yue, C., Ran, D.L., Yuan, S.S., Wei, W.K., Long, J.X., 2011. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virology* 517.

Zhang, X., Zhou, J., Wu, Y., Zheng, X., Ma, G., Wang, Z., Jin, Y., He, J., Yan, Y., 2009. Differential proteome analysis of host cells infected with porcine circovirus type 2. *J. Proteome Res.* 8 (11), 5111–5119.

Zhou, J.Y., Chen, Q.X., Ye, J.X., Shen, H.G., Chen, T.F., Shang, S.B., 2006. Serological investigation and genomic characterization of PCV2 isolates from different geographic regions of Zhejiang province in China. *Vet. Res. Comm.* 30, 205–220.

2. Detección y caracterización molecular del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en porcinos con y sin el síndrome multisistémico de emaciación post-destete de Colombia

Abstract

Porcine circovirus 2 (PCV2) is the major causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and is associated with different manifestations affecting pigs.

The main purpose of this study was to investigate the presence of PCV2 in piglets affected with PMWS and healthy pigs over a 7-year period (2002 -2009). In addition we aimed to analyze the phylogenetic relationships of the detected strains.

PCV2 DNA was found in cases associated with PMWS but also in healthy pigs with a persistent infection.

The ORF2 nucleotide sequences of 23 PCV2 strains could be divided into two groups: PCV2a and PCV2b. The main variations on amino acid sequences of the capsid protein were found within the immunoreactive areas.

The detection and molecular characterization of PCV2 strains for the first time in Colombia is reported.

Keywords: Porcine circovirus type 2 (PCV2); Post-weaning multi-systemic wasting; Genetic characterization

Introducción

El Circovirus porcino tipo 2(PCV2) es un miembro de la familia circoviridae formado por una cadena circular sencilla de ADN (Allan y Ellis, 2000). El virus tiene una amplia distribución a nivel mundial y es considerado como un importante patógeno emergente asociado a diferentes síndromes y enfermedades en porcinos, colectivamente designados como enfermedades asociadas al PCV2 (PCVD) (Segalés et al., 2005) o circovirus porcina (Almeida et al., 2004). El PCV2 es el agente etiológico del síndrome multisistémico de emaciación postdestete (PMWS) o forma sistémica, la manifestación clínica de mayor importancia económica para la industria porcina a nivel mundial (Chae et al., 2005).

El PMWS se caracteriza clínicamente por la presencia de emaciación, disnea, linfadenopatía y en algunos casos por diarrea, palidez e ictericia de los animales afectados (Harding, 2004). La lesión histopatológica más importante se observa en órganos linfoides y consiste en una extensiva depleción linfoide, infiltración de macrófagos y presencia ocasional de células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión basofílicos citoplasmáticos en forma de racimo de uvas (Rosell et al., 1999).

El PCV2 está conformado por una cadena circular sencilla de ADN la cual contiene entre 1767 a 1768 nucleótidos (Hamel et al., 1998). El genoma posee tres marcos abiertos de lectura (ORFs) (Niagro et al., 1998). El ORF1 codifica para proteínas relacionadas con la replicación viral: Rep (helicasa) y Rep' (*nickasa*) resultantes de procesos de corte y empalme alternativo (Mankertz and Hillenbrand, 2001; Mankertz et al., 2003). El ORF2 codifica para la proteína de la cápside, la única proteína estructural del virus y también el segmento más variable del genoma viral (Nawagitgul et al., 2000; Olvera et al., 2007). Finalmente, el ORF3 se encuentra inmerso dentro del ORF1, el cual codifica una proteína no esencial para la replicación pero fundamental en la patogénesis del virus (Liu et al., 2005; Karuppannan y Kwang, 2011).

El PCV2 se clasifica en dos principales genotipos: PCV2a y PCV2b (Segalés et al., 2008) los cuales se subdividen a su vez en diferentes grupos, 1A -1C y 2A-2E para PCV2b y PCV2a, respectivamente (Olvera et al., 2007). Un tercer genotipo, PCV2c ha sido reportado únicamente en Dinamarca (Dupont et al., 2008). El nuevo tipo referido como PCV1/2a fue reportado en Canadá en el 2009, posteriormente se encontró que estaba conformado por el ORF1 del circovirus porcino tipo 1 (PCV1) y el ORF2 del PCV2 (Gagnon et al., 2010). En China se describieron dos nuevos genotipos, PCV2d y PCV2e como resultado del análisis de secuencias regionales (Wang et al., 2009) pero análisis subsecuentes de los tales genotipos no corroboraron la nueva clasificación (Cortey et al., 2011).

En Sur América, se ha descrito la circulación del virus en Brasil desde 1988 (Zanella y Mores, 2003), en Argentina (Pereda et al., 2011) y en Chile (Noriega et al., 2007). En Colombia, los signos clínicos y las lesiones asociados con la infección por el PCV2 en porcinos de granjas intensivas ubicadas en diferentes departamentos fueron inicialmente reportados en el año 2006 (Clavijo et al., 2008) sin embargo, hasta el presente no se dispone de información genética de las cepas circulantes en el país. En este estudio se reportó por primera vez la detección molecular y la caracterización genética del ORF2 del virus en porcinos con y sin manifestaciones clínicas características asociadas al PMWS.

2. 1 Materiales y métodos

Inicialmente, mediante un estudio retrospectivo, se examinaron 110 sueros porcinos, obtenidos del banco de sueros del Laboratorio Nacional de Diagnóstico del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), colectados entre los años 2002- 2005 y almacenados a -70°C. Las muestras fueron seleccionadas de animales de precebo/levante (6–12 semanas de edad) de 22 granjas seropositivas previamente evaluadas por Clavijo et al, 2008. En cada granja se seleccionaron al azar cinco muestras de suero. También se incluyeron tejidos (ganglios linfáticos, tonsilas y bazo) almacenados en congelación a -70°C de 11 granjas con diagnóstico histopatológico y confirmación por

inmunohistoquímica de PMWS los cuales habían sido colectados entre julio del 2006 y mayo del 2007 (Clavijo et al., 2008). En la tabla 1 se presenta el origen geográfico de las muestras analizadas en el estudio retrospectivo.

Tabla 1. Características de las granjas y porcinos analizados en el estudio retrospectivo

Granja No.	Origen geográfico	Municipio	Muestras de suero			PMWS casos examinados		
			Año colección	Edad semanas	Historia PMWS	Fecha de la necropsia	Edad semanas	Muestras
1	Cundinamarca	Ubate	2004	6 - 12	No	Jul-2006	11	GL ^a , T ^b , B ^c
2	Cundinamarca	Guaduas	2005	6 - 12	No	Oct-2006	10	GL
3	Cundinamarca	San Antonio	2003	6 - 10	No			
4	Cundinamarca	La Vega	2004	6 - 12	No	Sep-2006	9	GL, B
5	Cundinamarca	Silvania	2003	6 - 10	No	Feb-2007	9	GL, T, R ^d
6	Cundinamarca	San Antonio	2005	6 - 12	No	Feb-2007	10	GL
7	Valle	Cartago	2002	6 - 12	No	Nov-2006	12	GL, T
8	Valle	Palmira	2005	6 - 9	No			
9	Valle	La Victoria	2005	6 - 12	No			
10	Valle	Palmira	2004	6 - 12	No	Oct-2006	14	GL
11	Valle	Cartago	2003	6 - 11	No	Feb-2007	12	GL
12	Antioquia	Don Matías	2005	6 - 10	No			
13	Antioquia	Medellín	2004	6 - 12	No	Feb-2007	8	GL
14	Antioquia	Don Matías	2004	6 - 11	No			
15	Antioquia	Don Matías	2004	6 - 12	No	Oct-2006	10	GL, T
16	Antioquia	Don Matías	2003	6 - 10	No			
17	Antioquia	Bello	2003	6 - 10	No			
18	Risaralda	Santa Rosa	2003	7 - 11	No	May-2007	14	GL, T
19	Risaralda	Santa Rosa	2002	6 - 10	No			
20	Risaralda	Caldas	2004	6 - 9	No			
21	Risaralda	Santa Rosa	2004	6 - 9	No			
22	Risaralda	Santa Rosa	2004	6 - 9	No			

a. GL= ganglio linfático, b. T= tonsila, c. B= bazo, d. R= riñón

Adicionalmente, se analizó el suero de cinco porcinos y muestras de tejidos colectados entre enero del 2009 y febrero del 2010 en granjas porcinas de producción intensiva de diferentes regiones del país (Tabla 2). Los criterios para la selección del suero en las 27 granjas seleccionadas fueron los siguientes: edad de los animales entre 8 y 15 semanas de edad, peso inferior a 60 Kg y no

evidencia clínica de PMWS.

Tabla 2. Características de las granjas y porcinos estudiados en las muestras colectadas durante el 2009-2010.

Granja No.	Origen geográfico	Municipio	Tipo de granja	Muestras de suero		Muestras de tejidos	
				No. porcinos	Edad en semanas	Edad en semanas	No. porcinos
1	Cundinamarca	Ubate	CC	5	10-15	8-15	4
2	Cundinamarca	Guaduas	CC	5	10-15	7 - 8	4
5	Cundinamarca	Silvania	CC	5	10-15	5 - 7	5
6	Cundinamarca	San Antonio T	CC	5	10-15		
7	Valle	Cartago	CC	5	10-15	6 - 7	2
8	Valle	Palmira	CC	5	8 -14	8 - 13	4
9	Valle	La Victoria	CC	5	10-15	8 - 12	3
10	Valle	Palmira	CC	5	10-15	8	1
11	Valle	Cartago	CC	5	10-15		
12	Antioquia	Don Matías	CC	5	10-15	16	1
13	Antioquia	Don Matías	CC	5	10-15	10	1
14	Antioquia	Don Matías	CC	5	10-15		
15	Antioquia	Don Matías	CC	5	10-15		
16	Antioquia	Medellín	CC	5	10-15		
17	Antioquia	Bello	CC	5	10-15		
18	Risaralda	Santa Rosa	CC	5	10-15	6 - 10	3
19	Risaralda	Santa Rosa	CC	5	10-15	14	1
20	Risaralda	Caldas	CC	5	10-15		
21	Risaralda	Santa Rosa	CC	5	10-15		
22	Risaralda	Santa Rosa	CC	5	10-15		
23	Cundinamarca	San Antonio T	CC	5	10-15	6 - 15	5
24	Cundinamarca	Gachancipá	CC	5	10-15	15	1
25	Cundinamarca	Santa Rosa	CC	5	10-15	8	2
26	Antioquia	Sta Rosa Osos	CC	5	10-15	8 - 12	4
27	Antioquia	Don Matías	CC	5	10-15	14	2
28	Antioquia	Don Matías	CC	5	10-15	12	2
29	Antioquia	Fredonia	M	5	10-15	8 - 15	5
				135			50

CC= ciclo completo, M= multiplicadora, ND= información no disponible

Igualmente, se analizaron 50 porcinos de 6 a 16 semanas de edad con manifestación clínica de retraso y pérdida de peso en 18 de las 27 granjas. Los veterinarios de las granjas participantes seleccionaron entre uno a cinco animales en cada explotación basados en criterios clínicos como pérdida de la condición corporal y síntomas adicionales como problemas respiratorios, diarrea y palidez.

Las muestras clínicas (ganglios linfáticos poplíteos, inguinal y mesentéricos, tonsila, bazo, y riñón) de aquellos animales con lesiones histopatológicas como depleción linfoide, neumonía intersticial y nefritis intersticial fueron colectadas para el estudio molecular. Las muestras se conservaron a -70°C hasta el proceso de extracción del ácido nucleico y realización de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

2.1.2 Extracción del ADN y detección por PCR del PCV2

Para la obtención del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) viral a partir del suero, se utilizó el kit de extracción comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Cat 51306, USA) utilizando 200 µl de suero y 20 mg de homogenizado de un pool de tejidos siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para la detección del PCV2, se realizó una técnica de PCR convencional usando cebadores previamente descritos por Quintana et al., 2002, los cuales amplifican un fragmento de 657 pares de base (pb). El cebador directo (5'-GCCAGTTCGTCACCCTTTC-3') se ubicó entre las posiciones 940 y 958 del genoma en el ORF1. El cebador reverso (5'-CTCCCGCACCTTCGGATAT-3') se localizó entre las posiciones 1578 y 1596 en el ORF2.

La mezcla de la reacción fue optimizada con 200 nM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1x PCR buffer, 500 nM de cada cebador y 0.05 U of Taq polymerase (Promega Cat. M8298, USA) en un volumen final de 25 µl. La reacción se corrió en un termociclador Bio Rad ALS-1296 (Bio-rad Laboratories, Inc. USA) con el siguiente perfil térmico: denaturación a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, anillamiento de los cebadores a 64 °C por 1 min, extensión inicial a 72 °C por 30 segundos y extensión final a 72 °C por 7 minutos (Anexo 1).

Los fragmentos amplificados fueron visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA Cat. A-9539, USA) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen Cat. 15581-044, USA). El fragmento de ADN amplificado fue visualizado empleando luz ultravioleta después de la tinción con EZ Vision™ Three (Amresco Cat. N-313, USA). La longitud del producto fue

verificada con un marcador estándar de Acido Desoxirribonucleico de 100 pb (Invitrogen Cat. 15628-019, USA). En cada reacción se utilizó como control positivo, ADN obtenido de un virus PCV2 (Número de acceso en el Genbank JF290418) gentilmente donado por el Dr. Michael Murtaugh del Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Minnesota, USA.

2.1.3 Amplificación por PCR del gen ORF2

Con base en el genoma completo basado de la cepa ZhuJi2003 (AY579893) publicada en el Gen Bank se diseñaron un par de cebadores para amplificar la secuencia completa del ORF2. El cebador directo (capFw 5'CCGTTGGAATGGTACTCCTC 3') se ubicó en las posiciones 825 y 844 del genoma en el ORF1 y el cebador reverso (capRw 5'ACAGCGCACTTCTTTTCGTTT3') se localizó entre las posiciones 1760 – 1741 en el ORF2. Estos cebadores amplificaron un producto de 935 pb.

La reacción se corrió en el termociclador descrito previamente empleando el siguiente perfil térmico: un ciclo at 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, anillamiento de los cebadores a 57 °C por 45 s, extensión inicial a 72 °C por 45 s y extensión final a 72 °C por 12 min (Anexo 2). Los fragmentos amplificados fueron visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA Cat. A-9539, USA) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen Cat. 15581-044, USA). El fragmento de ADN amplificado fue visualizado empleando luz ultravioleta después de la tinción con EZ Vision™ Three (Amresco Cat. N-313, USA). La longitud del producto fue verificada con un marcador estándar de Acido Desoxirribonucleico de 100 pb (Invitrogen Cat. 15628-019, USA).

La especificidad de los cebadores se evaluó empleando ácido nucleico de diferentes agentes vírales y bacterianos que afectan a los porcinos como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, (ATCC 27088), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Cepa J, Donación Universidad de Minnesota), *Haemophilus parasuis* (ATCC

19417), *Streptococcus suis* (ATCC 700794), virus de la Influenza porcina H1N1(A/SW/lowa/H1N1 NVSL 003 IDV 9501), virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (NVSL 130 PDV 9801), virus de la Enfermedad de Aujeszky (cepa Shope NVSL 070 – PDV), Parvovirus porcino (cepa Mengeling NVSL 080- PDV9501) y Circovirus porcino tipo 1 (PCV1). El ADN del PCV1 fue obtenido del sobrenadante de la línea celular PK15 ATCC CCL-33, las cuales están persistentemente infectadas con este virus.

La sensibilidad de la prueba se calculó a través del análisis de diluciones seriales 10^{-1} de ADN obtenido de la cepa PCV2 utilizada como control positivo con un título viral de $10^{-6.0}$ Log₁₀ TCID₅₀ en células PK15 y cuya concentración fue de 33.64 ng/μl determinada en un Thermo Scientific Nano Drop 1000 (USA).

2.1.4 Secuencias virales y análisis filogenético

Los fragmentos de ADN obtenidos fueron purificados empleando el kit comercial QIAquick PCR Purification kit Cat. No. 2878 (USA) de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante. Los productos de la PCR fueron usados como templates en los ciclos de secuenciación empleando los primers capFw y capRw descritos anteriormente siendo luego secuenciados en ambas direcciones. Este procedimiento se realizó en un laboratorio externo (Macrogen Sequencing Service, USA).

Posteriormente, se empleó el software Bio-Edit para Windows® versión 7.0.9 (IBIS BIOSCIENCES, USA) para la determinación de secuencias consenso y el algoritmo ClustalW del servidor EBI para el alineamiento múltiple de las secuencias. La identidad entre las secuencias a nivel de nucleótidos y aminoácidos se determinó empleando el programa BioEdit package v.7.0.9 (Hall, 1999). El árbol filogenético se construyó con las 23 secuencias colombianas del ORF2 obtenidas y 68 secuencias publicadas en el Gen Bank representativas de todos los genotipos del PCV2 (Anexo 3), utilizando el método de Neighbor-joining de acuerdo con los parámetro establecidos por Kimura mediante el software MEGA v.5.0 (Tamura et al., 2007) con 1000 replicas *bootstrap*. Como grupo

externo se empleo la secuencia FJ475129 del PCV1.

2.2. Resultados

2.2.1 Detección del ADN viral para el PCV2

En el análisis retrospectivo de los sueros colectados entre el 2002 y 2005, se detectaron por medio de la técnica PCR convencional 21 (19.1%) muestras de sueros positivos de los 110 examinados (Fig. 1), en granjas localizadas en los departamentos de Cundinamarca (6), Risaralda (4) y Valle (3) (Tabla 3). Adicionalmente, el ADN viral fue identificado en todas las muestras de tejidos colectados durante los años 2006 - 2007. En relación con el tiempo, las primeras muestras positivas se detectaron en sueros colectados en el año 2002 en granjas ubicadas en el Valle y Risaralda.

Fig 1. Detección del PCV2 en muestras de suero por la técnica PCR convencional. Línea M=Marcador de peso molecular de 100 pb.; línea 1-9:muestras de campo positivas, línea 10: control positivo para PCR.

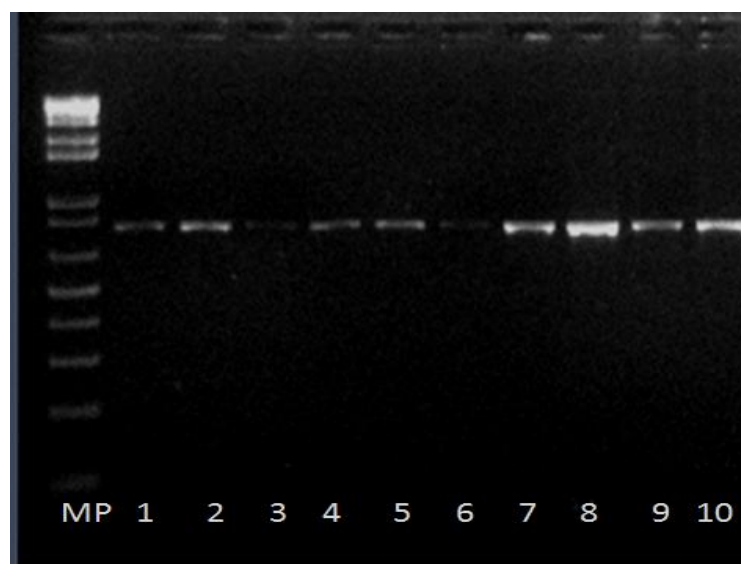


Tabla 3. Detección del PCV2 por PCR convencional en muestras de suero colectados entre el 2002 y el 2005

Año	Granjas positivas	Sueros positivos
2002	2/2	2/10
2003	3/6	4/30
2004	4/9	6/45
2005	4/5	9/25
	13/22 (59.1%)	21/110 (19.1%)

Por otro lado, el ADN del PCV2 fué identificado en 34 muestras de suero (25.2%) de 14 (51.8%) de las 27 granjas estudiadas entre los años 2009 – 2010. De los 50 porcinos muestreados que presentaron signos clínicos compatibles con PMWS, 40 resultaron positivos por PCR (Tabla 4). Estas mismas muestras habían mostrado por histopatología lesiones asociadas al PMWS como inflamación granulomatosa, depleción linfóide y en algunos casos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en macrófagos (Díaz, 2010).

Tabla 4. Detección del PCV2 por PCR convencional en muestras de suero y muestras de tejidos colectados durante el 2009 -2010

Origen geográfico	Porcinos sanos		Porcinos PMWS sospechosos	
	Granjas	Sueros positivos	Granjas	Tejidos positivos
Antioquia	7/10 *	20/50**	6/6	15/15
Cundinamarca	2/7	4/35	6/6	12/21
Risaralda	3/5	3/25	1/2	3/4
Valle	2/5	7/35	4/4	10/10
	14/27 (51.8%)	34/135 (25.2%)	17/18 (94.4%)	40/50 (80%)

* N. de granjas evaluadas/No. Positivas; ** No. muestras examinadas/No. PCR positivos

2.2.2 Especificidad y sensibilidad de la PCR convencional

Ninguno de los patógenos virales o bacterianos fueron detectados por los cebadores utilizados para la amplificación del ORF2. La prueba detectó el ADN del control positivo hasta una dilución de 10^{-3} correspondiente a un título viral de 2.2×10^{-3} TCID₅₀/ml.

2.2.3 Caracterización genética

Todas las 23 secuencias ORF2 del PCV2 (ORF2 PCV2) obtenidas en el presente estudio mostraron una longitud de 702 pb. En el análisis de matriz de distancias se encontró una identidad a nivel de nucleótidos y aminoácidos de 91.4% a 100%. Los genotipos PCV2a y PCV2b identificados mostraron una identidad a nivel de aminoácidos del 98-100% y del 98.8%-100% respectivamente. Ambos genotipos fueron detectados tanto en animales sanos y como en cerdos con evidencias clínicas y patológicas de la forma sistémica de la enfermedad (Tabla 5).

Las 19 secuencias clasificadas dentro del genotipo PCV2b poseen la secuencia característica en el ORF2 CCCCGC en los nucleótidos 268–269 y aminoácidos 88–89 que codifican para la prolina y arginina (PR). En esas mismas posiciones, las cuatro secuencias clasificadas en el genotipo PCV2a contienen la secuencia AAAATC que codifica para la lisina e isoleucina (KI). Se observaron 16 sustituciones de nucleótidos en las secuencias ORF2 de cepas PCV2a colombianas las cuales llevaron a once sustituciones a nivel de aminoácidos en las siguientes posiciones: 47-T-A, 59-R-A, 63-T-R, 75-K-N, 76-L-I, 134-T-N, 136-L-Q, 183-L-I, 187-L-I, 206-K-I y 232-N-K. Por otro lado, se encontraron 15 sustituciones en el ORF2 de las cepas PCV2b colombianas que originaron cinco sustituciones a nivel de aminoácidos: 57-I-V, 63-R-K, 190-A-T, 226-L-F y 228-D-A.

2.2.4 Análisis filogenético

El análisis filogenético de las 23 secuencias colombianas ORF2 identificadas PCV2 junto con 68 secuencias publicadas en el Gen Bank representativas de todos los genotipos del PCV2 se presenta en la Figura 2. El árbol filogenético obtenido representa todos los grupos y subgrupos previamente descritos por Olvera et al., 2007. Las 23 secuencias se dividieron en los genotipos: PCV2b (n=19) y PCV2a (n=4).

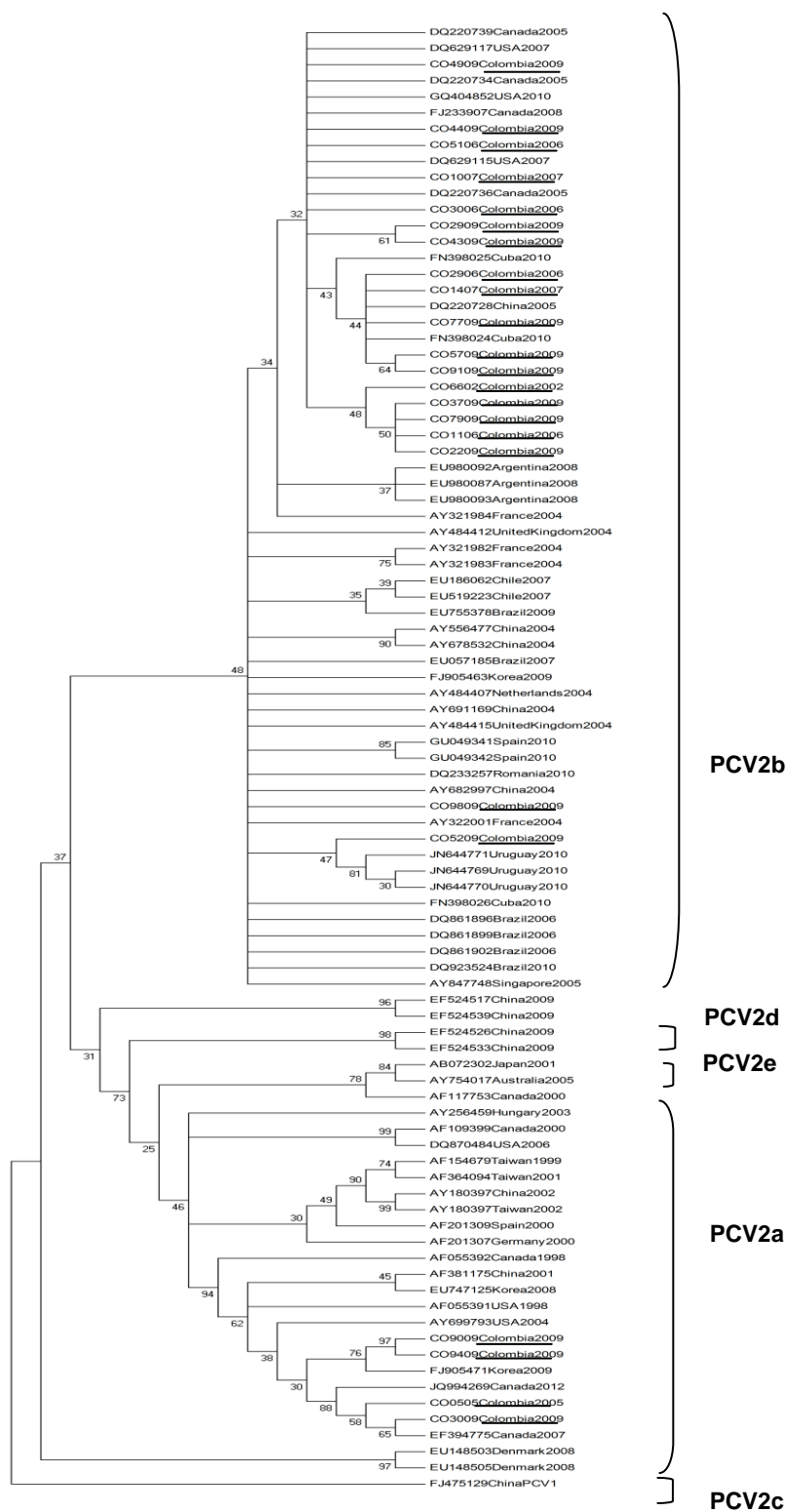
Se puede observar que cuatro secuencias ORF2 PCV2a colombianas se agruparon con cepas asociadas a enfermedad clínica por PCV2 en Canadá (1998, 2007, 2012), USA (1998, 2004), China (2001), Corea (2008, 2009) en un grupo bien definido dentro del PCV2a de acuerdo con la nomenclatura establecida por Grau-Roma et al. 2008, y soportado por altos valores de confianza. El resto de las secuencias se ubicaron dentro del genotipo PCV2b cercanamente relacionadas con secuencias de Canadá (2007, 2012), USA (2007-2010), Europa, Asia, Cuba y países de sur América (Figura 2).

Para comparar las secuencias obtenidas con cepas PCV2b circulante en Sur América se compararon con seis cepas Brasileñas (No. de acceso DQ861896, DQ861899, DQ861902, EU057185, DQ923524 y EU755378), encontrándose una alta identidad a nivel de nucleótidos (98.1% -99.8%) y aminoácidos (94.4 % - 97.8%). La comparación con cepas argentinas (EU980087, EU980092 y EU980093) reveló una identidad en los rangos de 99% a 99.8% y 98.7%-100% a nivel de nucleótidos y aminoácidos respectivamente. Con las cepas uruguayas (JN644769, JN644770, JN644771), la identidad fue de 98.4%- 99.7% a nivel de nucleótidos y del (94,4 % - 97.8%) a nivel de aminoácidos. En contraste, la identidad tanto para nucleótidos (92,7% - 95.8%) como para aminoácidos (90.5% - 95.2%) fue menor al compararlas con las cepas chilenas EU186062 y EU519223.

Tabla 5. Origen de las 23 cepas PCV2 colombianas examinadas en este estudio

Año de colección	Identificación	Origen geográfico	Granja No.	Condición clínica	Origen de la muestra	Genotipo
2002	CO6602	Valle	7	Sano	suero	PCV-2b
2005	CO0505	Cundinamarca	2	Sano	suero	PCV-2a
2006	CO1106	Cundinamarca	2	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2006	CO2906	Valle	7	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2006	CO3006	Valle	18	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2006	CO5106	Valle	10	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2007	CO1007	Cundinamarca	6	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2007	CO1407	Antioquia	13	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2009	CO2209	Antioquia	22	Desmedro	Aislamiento en células PK15	PCV-2b
2009	CO2909	Valle	8	Sano	suero	PCV-2b
2009	CO3009	Valle	21	Sano	suero	PCV-2a
2009	CO3709	Valle	37	Desmedro	Aislamiento en células PK15	PCV-2b
2009	CO4309	Valle	8	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2009	CO4409	Antioquia	12	Sano	suero	PCV-2b
2009	CO4909	Cundinamarca	1	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2009	CO5209	Antioquia	29	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2009	CO5709	Antioquia	26	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2009	CO7709	Antioquia	5	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2009	CO7909	Antioquia	28	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2b
2009	CO9009	Valle	18	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2a
2009	CO9109	Antioquia	29	Sano	suero	PCV-2b
2009	CO9409	Valle	18	Desmedro	Ganglio linfático	PCV-2a
2009	CO9809	Risaralda	20	Sano	suero	PCV-2b

Fig.2. Árbol filogenético construido por el método de neighbor-joining basado en la secuencia de 702 nucleótidos del ORF2 PCV2. Las 23 cepas colombianas están subrayadas. Se incluyeron 68 secuencias ORF2 publicadas en el Gen Bank y la cepa PCV1 FJ475129 como grupo externo.



2.3 Discusión

Los estudios previos realizados en Colombia (Clavijo et al., 2008; Díaz C.A, 2010), reportaron la presencia del PCV2 en granjas intensivas, asociado con diferentes formas clínicas de la enfermedad. En este trabajo, se detectó infección por el PCV2 en el 22.4% y 83.6% de las muestras de suero y tejidos examinadas señalando la importancia de este patógeno en las explotaciones porcinas del país.

Los estudios retrospectivos demostraron que el virus estaba circulando en Colombia desde el año 2002 causando infección subclínica la cual no fue diagnosticada en aquel momento. Sin embargo hasta los años 2006 -2007 se presentaron brotes epizooticos de PMWS en diferentes regiones del país los que causaron severos problemas sanitarios en las granjas afectadas (Clavijo et al., 2008). Las muestras de tejidos colectadas durante este periodo de animales con signos y lesiones características de PMWS confirman el diagnóstico de la enfermedad.

Con relación a las muestras colectadas durante los años 2009 -2010, el 80% de tejidos y el 25.2% de los sueros evaluados fueron positivos por PCR al PCV2. Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron detectar el PCV2 tanto en las muestras tomadas de animales con PMWS como en las muestras de suero colectadas de animales aparentemente sanos sugiriendo que la infección por el PCV2 en las granjas porcinas colombianas puede ocurrir en ausencia de signos y lesiones típicas de PMWS u otra condición clínica asociada con el PCV2. Con base en estudios serológicos se sabe que la infección por el PCV2 es ubicua a nivel mundial (Segalés et al., 2005), mientras que la prevalencia de la enfermedad clínica es mucho más baja, la forma subclínica de la infección es actualmente la forma más común de la infección por el PCV2 (Segalés, 2012).

La simple detección del PCV2 sin los tres criterios de diagnóstico reconocidos internacionalmente no indica PMWS, solamente infección del animal por el

PCV2 (Chae, 2004). Sin embargo, en este trabajo no se encontró ninguna relación entre genotipo y la patogenicidad de la cepa por lo que no se puede concluir que los genotipos encontrados en porcinos aparentemente sanos no sean patogénicos.

Estudios retrospectivos realizados en otros países indican que el PCV2 permaneció desapercibido por décadas antes de 1991 cuando en Canadá se reportó por primera vez, la aparición de una enfermedad emergente en porcinos, caracterizada por la pérdida progresiva de peso, dificultad respiratoria y palidez de la piel (Clark, 1997; Harding, 1997). Los estudios retrospectivos realizados en Alemania con archivos de material de necropsia permitieron detectar el genoma del PCV2 en una muestra colectada en 1962 (Jacobsen et al, 2009). Por otro lado, en el Reino Unido se detectó por PCR tiempo real con sondas (TaqMan - PCR) e inmunohistoquímica, la presencia del virus en muestras de tejidos fijados en formol colectadas en los años setenta (Grierson et al., 2004).

En Suiza, la primera evidencia de infección por PCV2 se detectó a través del análisis histopatológico e inmunohistoquímica de muestras de tejidos con lesiones de PMWS colectadas en 1986 (Staebler et al., 2005). Un estudio similar realizado en España reveló la presencia del PCV2 en tejidos con lesiones típicas de PMWS colectados en 1986 (Rodríguez-Arriola et al., 2003). En Japón, los primeros casos reportados datan de 1989 (Mori et al., 2000) y en Tailandia (Kiatipattanasakul-Banlunara et al., 2002), las primeras evidencias son de 1993. En conclusión es posible suponer que el virus tenía una ocurrencia subclínica en las poblaciones porcinas de diferentes regiones del mundo.

En este estudio, se caracterizó y analizo filogenéticamente 23 secuencias completas ORF2 de virus PCV2 colombianos del periodo 2002 - 2009 obtenidas de porcinos sanos y con PMWS en granjas intensivas ubicadas en las regiones de mayor producción porcícola del país (Antioquia, Cundinamarca, Risaralda y Valle). La caracterización molecular de las secuencias seleccionadas se basó en

el análisis del gen de cápside del PCV2. Esta región es apropiada para este tipo de análisis ya que se ha considerado como un marcador filogenético fiable porque permite reconstruir el mismo árbol filogenético que se obtiene al analizar el genoma completo del virus (Olvera et al., 2007).

Por otro lado se debe destacar que los principales sitios de reemplazo a nivel de aminoácidos fueron detectados en las posiciones 57 -89, 121 – 134 y 190- 210 (Fig.3) que corresponde a regiones altamente variables dentro del ORF2 las cuales han sido previamente reportadas (Larochelle et al., 2002; Grau-Roma et al., 2008). Larochelle et al. (2002). Esta heterogenicidad a nivel de aminoácidos se ha relacionado con áreas inmunoreactivas dominantes en la proteína de la cápside del PCV2 (Larochelle et al. 2002).

En este trabajo, no se encontró una posible relación entre el genotipo del PCV2 y el año de detección. La cepa CO6602 colectada en el 2002 pertenece al genotipo PCV2b, mientras que en el periodo 2005-2009 se detectaron cepas tanto PCV2a como PCV2b, sin embargo el mayor número de cepas correspondió al genotipo PCV2b. Esto sugiere que el PCV2b ha sido el genotipo dominante durante los últimos años en las granjas porcinas del país. Estudios realizados por otros grupos de investigadores han revelado que ambos genotipos pueden ser asociados con PCVD en granjas afectadas y no afectadas (Cheung et al., 2007; Carman et al., 2006; Grau-Roma et al., 2008; Wiederkehr et al., 2009). Sin embargo, el genotipo PCV2b continua siendo el más prevalente en infecciones naturales a nivel mundial (Takahagi et al., 2008; Timmusk et al., 2008; Cortey et al., 2011).

Por otro lado, los estudios de caracterización realizados en diferentes países han reportado un cambio del PCV2a al genotipo PCV2b, lo cual se relacionó con la ocurrencia de brotes severos de PMWS en Canadá (Gagnon et al., 2007), Suecia (Timmusk et al., 2008), Suiza (Wiederkehr et al., 2009) y España (Cortey et al., 2010), por lo cual se sugirió que el genotipo PCV2b podría ser más virulento que el PCV2a. Esto podría explicar la ocurrencia de brotes epizooticos

de PMWS en granjas de Colombia durante el periodo 2006 -2009. En la granja 2 se detectó un cambio del PCV2a (2005) al PCV2b (2006) pero en la granja 18 la variación fue del PCV2b (2006) al PCV2a (2009). Así mismo, al comparar dos cepas PCV2b de la granja 7 (CO6602 y CO2906) colectadas en los años 2002 y 2006 respectivamente se encontró una variación a nivel de aminoácidos en el ORF2 menor al 1.3%.

Teniendo en cuenta que Colombia tiene un amplio intercambio comercial con países de Norte América, abarcando la importación de animales vivos y semen, no es sorprendente que las cepas analizadas en este estudio estén cercanamente relacionadas con cepas de Canadá y Estados Unidos aisladas durante el 2004–2007, mostrando una identidad a nivel de aminoácidos entre el 74.7% y el 100% respectivamente. En algunos países, la presencia del PCV2 ha sido relacionada con la importación de cerdos (Chiarelli-Neto et al., 2009; Manokaran et al., 2008) y el movimiento de animales asintomáticos infectados por el PCV2 debido al activo comercio internacional de porcinos a lo cual se atribuye la rápida diseminación de la enfermedad a nivel mundial (Firth et al., 2009). En el estudio no se pudo establecer el origen de los animales introducidos para el mejoramiento genético de las granjas durante el periodo 2002- 2009, por lo cual es difícil establecer el año exacto de introducción de la enfermedad y la fuente de infección del PCV2 en la población porcina de Colombia.

Otras fuentes de infección, tales como el inapropiado uso de vacunas podría ser descartado teniendo en cuenta que hasta el momento solo se han desarrollado vacunas inactivadas o vacunas de proteínas elaboradas con base en el ORF2 del virus (Beach et al., 2012).

2.4 Conclusiones

- En este trabajo, se detectó infección por el PCV2 en el 22.4% y 83.6% de las muestras de suero y tejidos respectivamente examinadas señalando la importancia de este agente en las explotaciones porcinas del país

- Los resultados permitieron demostrar la circulación de cepas PCV2 de los genotipos PCV2a y PCV2b.
- El genotipo PCV2b fue el genotipo predominante durante el periodo analizado. En la actualidad, el genotipo PCV2b parece ser predominante en los sistemas de producción porcina de Colombia.
- Los genotipos PCV2a y PCV2b identificados mostraron una identidad a nivel de aminoácidos del 98-100% y del 98.8%-100% respectivamente.
- Los principales sitios de variación genética en el ORF2 de las cepas colombianas se localizaron en las posiciones 57-89, 121-134 y 190-210 que corresponde a regiones altamente variables previamente descritas.
- No se encontró relación entre el genotipo del PCV2 y la manifestación clínica de la enfermedad, incluso ambos genotipos fueron detectados en animales sanos y enfermos.

2.5 Recomendaciones

En el presente estudio pudo confirmarse que el PCV2 es un agente infeccioso capaz de inducir enfermedad clínica y subclínica en los porcinos infectados. Teniendo en cuenta la naturaleza multifactorial de la enfermedad, en la evaluación de casos sospechosos de campo debe considerarse la presencia de factores desencadenantes de la misma en las condiciones particulares de cada granja o región geográfica del país.

Teniendo en cuenta la capacidad de mutación y recombinación del PCV2 es posible la aparición de nuevos genotipos o variantes, por tanto los veterinarios de campo y los profesionales de los servicios de diagnóstico oficial y particulares deben estar atentos y capacitados para un correcto diagnóstico de la enfermedad e interpretación de los resultados de laboratorio.

En aquellas explotaciones donde se presenten casos compatibles con la forma


```

.....90 .....100 .....110 .....120 .....130 .....140 .....150 .....160

CO7909Colombia2009 PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNISSRHTI TQPFYSHSRY
CO0505Colombia2005 .....T.KI. I..... ..... T..... P..... P.....
CO1007Colombia2007 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO1106Colombia2006 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO1407Colombia2007 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO2209Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO2906Colombia2006 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO2909Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO3006Colombia2006 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO3009Colombia2009 .....T.KI. I..... ..... T..... P..N..... P.....
CO3709Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO4309Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO4409Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO4909Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO5106Colombia2006 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO5209Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO5709Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO6602Colombia2002 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO7709Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO9009Colombia2009 .....T.KI. I..... ..... T..... P..N.Q.... P.....
CO9109Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO9409Colombia2009 .....T.KI. I..... ..... T..... P..N.Q.... P.....
CO9809Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....

```

```

.....170 .....180 .....190 .....200 .....210.....220.....230 ...

CO7909Colombia2009 FTPKPVLDST IDYFQPNKR NQLWLRlQTA GNVdHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDPp LNP*
CO0505Colombia2005 ..... ..... .....S R..... .....K...D .....
CO1007Colombia2007 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO1106Colombia2006 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO1407Colombia2007 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO2209Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO2906Colombia2006 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO2909Colombia2009 ..... ..... .....T..... ..... .....
CO3006Colombia2006 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO3009Colombia2009 ..... ..... ..I.....S R..... .....K...D .....
CO3709Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO4309Colombia2009 ..... ..... .....T..... ..... .....
CO4409Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO4909Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO5106Colombia2006 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO5209Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO5709Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO6602Colombia2002 ..... ..... ..... ..... .....F.A...
CO7709Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO9009Colombia2009 ..... ..... .....I..S R..... .....D .....K..
CO9109Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....
CO9409Colombia2009 ..... ..... .....I..S R..... .....D .....K..
CO9809Colombia2009 ..... ..... ..... ..... ..... .....

```

Referencias

- Allan, G., Ellis, J., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* 12, 3–14.
- Almeida, M.R., Silva Jr., A., Castro, L.A., Almeida, S.R., Monnerat, F.S., Oliveira, F.S., Moraes, M.P., 2004. Porcine circoviruses. *Virus Rev. Res.* 09, 32–42.
- Beach, N.M., Meng, X.J., 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164(1-2), 33-42
- Bucarey, S.A., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Saenz, L., Zuniga, A. and Tobar, J.A., 2009. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine* 27 (42), 5781-5790
- Cadar, D., Csagola, A., Dan, A., Deim, Z., Spinu, M., Miclaus, V., Kobolkuti, L., Czirjak, G. and Tuboly, T., 2007. Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania—short communication. *Acta Vet. Hung.* 55 (1), 151-156
- Carman, S., McEwen, B., DeLay, J., van Dreumel, T., Lusi, P., Cai, H. and Fairles, J. 2006. Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Can Vet J.* 47(8), 761-762.
- Chae, C., 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 168, 41–49.
- Cheung, A.K., Lager, K.M., Kohutyuk, O.I., Vincent, A.L., Henry, S.C., Baker, R.B., Rowland, R.R. and Dunham, A.G., 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch. Virol.* 152 (5), 1035-1044

Chiarelli-Neto, O., Yotoko, K.S., Vidigal, P.M., Silva, F.M., Castro, L.A., Fietto, J.L., Silva Jr., A., Almeida, M.R., 2009. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Res.* 140, 57–6

Choi,J., Stevenson,G.W., Kiupel,M., Harrach,B., Anothayanontha,L., Kanitz,C.L. and Mittal,S.K., 2002. Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome *Can. J. Vet. Res.* 66 (4), 217-224

Clavijo J. et al. (2008). Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, p 550.

Cortey, M., Olvera,A., Grau-Roma, L.,Segalés, J., 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet. Microbiol.* 149 (3–4), 522–523.

Cortey,M., Pileri, E., Sibila, M., Pujols, J., Balasch, M., Plana, J.and Segalés,J. 2011. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV- 2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J.* 187(3), 363- 368.

De Boisseson,C., Beven,V., Bigarre,L., Thiery,R., Rose,N., Eveno,E., Madec,F. and Jestin,A., 2004.Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs.*J. Gen. Virol.* 85 (PT 2), 293-304

Dan, A.,Molnar,T., Biksi,I., Glavits,R., Shaheim,M. and Harrach,B., 2003. Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases.*Acta Vet. Hung.* 51 (4), 551-562

Dezen, D., Rijsewijk, F.A., Teixeira, T.F., Holz, C.L., Cibulski, S.P., Franco, A.C., Dellagostin, O.A. and Roehe, P.M., 2010. Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: applications on detection, sequencing and virus isolation. *Res. Vet. Sci.* 88 (3), 436-440

Diaz, C.A., 2010. Caracterización epidemiológica del Síndrome de Emaciación Postdestete (PMWS) en granjas tecnificadas de Colombia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* 128, 56–64

Fenau, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Xu, Y., Potts, B. and Meng, X.J., 2004. Detection and in vitro and in vivo characterization of porcine circovirus DNA from a porcine-derived commercial pepsin product. *J. Gen. Virol.* 85 (PT 11), 3377-3382

Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J. Virol.* 83 (24), 12813–12821.

Fort, M., Sibila, M., Nofrarias, M., Perez-Martin, E., Olvera, A., Mateu, E. and Segales, J., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137 (3-4), 226-234

Gagnon, C.A., Music, N., Fontaine, G., Tremblay, D. and Harel, J., 2010. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol.* 144(1-2), 18-23.

Gagnon, C.A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M.H., Houde, A. and Elahi, S.M. 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J.* 48, 811-819.

Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., López-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segales, J., 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 128, 23–35

Grierson S.S., King D.P., Sandvik T., Hicks D., Spencer Y., Drew T.W., Banks M., 2004. Detection and genetic typing of type 2 porcine circovirus in archived pig tissues from the UK. *Arch Virol.* 149, 1171-1183

Grierson, S.S., King, D.P., Wellenberg, G.J. and Banks, M., 2004. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res. Vet. Sci.* 77 (3), 265-268

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95- 98

Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72, 5262–5267.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Sachvie, C., Grudeski, E. and Nayar, G.P., 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Res.* 64 (1), 44-52

Harding, J.C., 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet. Microbiol.* 98, 131–135.

Jacobsen B., Krueger L., Seeliger F., Bruegmann M., Segales J., Baumgaertner W., 2009. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol.* 138 (1-2), 27-33.

Kiatipattanasakul-Banlunara W.ma H., Doi K.,2002.Detection of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) DNA by Nested PCR from Formalin Fixed Tissues of Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) Pigs in Thailand. *J Vet Med Sci.* May; 64(5), 449-52

Kim, H.K., Luo, Y., .Moon, H.J., Park, S.J., Keum, H.O., Rho, S. and Park, B.K., 2009. Phylogenetic and recombination analysis of .genomic sequences of PCV2 isolated in Korea. *Virus Genes* 39 (3), 352-358

Karuppannan, A.K., Kwang, J., 2011. ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the virus. *Virol.* 410 (2011), 248–256

Larochelle, R., Magar, R., D'Allaire, S., .2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res.* 90, 101–112

Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang,C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wilson, M.L., Ndjango, J.B., Peeters, M., Gross-Camp, N.D., Muller, M.N., Hahn, B.H., Wolfe, N.D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S.Z. and Delwart, E., 2010.Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces.*J. Virol.* 84 (4), 1674-1682 (2010)

Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus induced apoptosis. *J. Virol.* 79, 8262–8274.

Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnould, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., Jestin, A., 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 81, 1815–1824.

Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J.M., LeCann, P., Jestin, A., Segales, J., Chmielewicz, B., Plana-Duran, J. and Soike, D., 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 66 (1), 65-77

Mankertz, A., Hillenbrand, B., 2001. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virol.* 279, 429–438

Mankertz, A., Mueller, B., Steinfeldt, T., Schmitt, C., Finsterbusch, T., 2003. New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *J. Virol.* 77 (18), 9885–9893.

Manokaran, G., Lin, Y.-N., Soh, M.-L., Lim, E. A.-S., Lim, C.-W., Tan, B.-H., 2008. Detection of porcine circovirus type 2 in pigs imported from Indonesia. *Vet. Microbiol.* 132, 165–170.

Martins Gomes de Castro, A.M., Cortez, A., Heinemann, M.B., Brandao, P.E. and Richtzenhain, L.J., 2007. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2) *Arch. Virol.* 152 (8), 1435-1445

Martin, H., Le Potier, M.F., Maris, P., 2008. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *Vet J.* 177(3), 388-93

Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M. and Allan, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79

(Pt 9), 2171-2179

Mori, M., Sato, K., Akachi, S., Asahi, S., Taniguchi, S., Narita, M., 2000. Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. *Vet Pathol.* 37, 667–669

Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81, 2281–2287.

Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D., 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 143 (9), 1723–1744.

Noriega, J., Reyes, P., Bucarey, S., 2007. Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. *Avances en Ciencias Veterinarias* 22, 62–71.

Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virol.* 357, 175–185.

Pereda A, Piñeyro P, Bratanich A, Quiroga M A, Bucafusco D, Craig M I, Cappuccio J, Machuca M, Rimondi A, Dibárbora M, Sanguinetti H R, Perfumo J C., 2011. Genetic Characterization of Porcine Circovirus Type 2 from Pigs with Porcine Circovirus Associated Diseases in Argentina. *ISRN Veterinary Science*, Article ID 560905, doi:10.5402/2011/560905

Perez, L.J., Diaz de Arce, H. and Frias, M.T., 2010. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 strains present in Cuban swine herds. *Res. Vet. Sci.* 89 (2), 301-305

Quintana J, Balasch M, Segalés J, Calsamiglia M, Rodríguez-Arrioja GM, Plana-Durán J, Domingo M., 2002. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Vet Res.* 33(3), 229-237.

Ramos N, Mirazo S, Castro G, Arbiza J. ,2012. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from piglets with exudative epidermitis in Uruguay. *Res Vet Sci.* 93(2), 1042-1045

Rodriguez-Arrioja, Segales J, Roseli C, Rovira A, Pujols J, Plana Durán J, Domingo M. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med* 50, 99-101, 2003

Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arrioja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120, 59–78.

Takahagi, Y., Nishiyama, Y., Toki, S., Yonekita, T., Morimatsu, F. and Murakami, H. 2008. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Vet Med Sci.* 70(6), 603-606.

Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119–142.

Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis *Virus Res.* 164, 10–19

Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M.,

Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet. Rec.* 162, 867–868.

Staebler S, Sydler T, Buergi E, McCullough K, McNeilly F, Allan G, Pospischil A., 2005. PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. *Vet J.* 170, 132–134

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599

Timmusk, S., Wallgren, P., Brunborg, I., Wikström, F., Allan, G., Meehan, B., McMenamy, M., McNeilly, F., Fuxler, L., Belák, K., Pödersoo, D., Saar, T., Berg, M. and Fossum, C. 2008. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes* 36(3), 509-520.

Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z. and Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145 (1), 151-156

Wiederkehr, D.D., Sydler, T., Buergi, E., Haessig, M., Zimmermann, D., Pospischil, A., Brugnera, E. and Sidler, X. 2009. A new emerging genotype subgroup within PCV -2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Vet Microbiol.* 136(1-2), 27-35.

Zanella, J.R.C., Mores, N., 2003. Diagnostic of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Swine in Brazil caused by porcine circovirus type 2 (PCV2). *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55, 522–527.

Anexo 1. Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del PCV2

Objetivo

Descripción de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
para la detección del PCV2 en muestras de fluidos y tejidos

1. Cebadores:

Nombre	Secuencias 5'- 3'	Número acceso	Posición genoma	Longitud del amplicon (bp)
PCV7	GCCAGTTCGTCACCCTTTC	AF027217 (Hamel et al., 1998)	940- 958	657
PCV17	CTCCCGCACCTTCGGATAT		1578- 1596	

2. Mezcla de la reacción:

Reactivo	Distribuidor	Concentración final	Cantidad/ muestra (μ l)
Agua			12,5
Buffer PCR	Promega	1x	5
MgCl ₂	Promega	3mM	3
dNTPs	Invitrogen	0.2 mM/dNTP	0,5
PCV7	IDT Technologies	0.5 μ M	0,625
PCV17	IDT Technologies	0.5 μ M	0,625
Taq Polimerasa	Promega	0,05 U/ μ l	0,25
Total mezcla			22.5 μ l
ADN			2.5 μ l

3. Condiciones de la PCR

No. De ciclos	° C	Tiempo
1	94	5 minutos
35	94	30 seg
	64	1 minuto
	72	30 seg
1	72	7 minutos
1	4	∞

La amplificación es realizada en un termociclador Bio Rad ALS-1296 (Bio-rad Laboratories, Inc. USA).

4. Visualización

Los fragmentos amplificados son visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA A-9539) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen 15581-044) teñidos con EZ Vision™ Three (Amresco N-313).

Referencia:

Quintana J, Balasch M, Segalés J, Calsamiglia M, Rodríguez-Arrioja GM, Plana-Duran J, Domingo M. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type (PCV2) in rabbits and mice., 2002. Veterinary Research 33, 229-237.

Anexo 2. Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del ORF2 del circovirus porcino tipo 2 (PCV2)

Objetivo

Descripción de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del ORF2 del PCV2

1. Cebadores

Nombre	Secuencias 5'- 3'	Número acceso	Posición genoma	Longitud del amplicon (bp)
CapFw	CCGTTGGAATGGTACTCCTC	AY579893 (Yu & Zhang.,2004)	825 - 844	935
Cap Rw	ACAGCGCACTTCTTTGTTTT		1760 – 1741	

2. Mezcla de la reacción:

Reactivo	Distribuidor	Concentraciónfinal	Cantidad/ muestra (μl)
Agua			12,25
Buffer PCR	Promega	1x	5
MgCl ₂	Promega	1.5mM	1,5
dNTPs	Invitrogen	0.2 mM/dNTP	0,5
CapFw	IDT Technologies	0.6 μM	0,75
Cap Rw	IDT Technologies	0.6 μM	0,75
Taq Polimerasa	Promega	0,05 U/μl	0,25
Total mezcla			21
ADN			4

3. Condiciones de la PCR

No. De ciclos	° C	Tiempo
1	94	5 minutos
35	94	45 seg
	57	45 seg
	72	45 seg
1	72	12 minutos
1	4	∞

La amplificación fué realizada en un termociclador Bio Rad ALS-1296 (Bio-rad Laboratories, Inc. USA).

4. Visualización

Los fragmentos amplificados son visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA A-9539) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen 15581-044) teñidos con EZ Vision™ Three (Amresco N-313).

Anexo 3. Número de acceso al Gen Bank y origen geográfico de las 68 secuencias incluidas en el análisis filogenético de gen ORF2 del PCV2.

GenBank # acceso	PCV2 cepa ID/original	Pais de origen	Genotipo	Referencia
AB072302	No. 26	Japan	PCV-2a	Imai et al. (2001)
AF055391	nd	USA	PCV-2a	Meehan et al.(1998)
AF055392	nd	Canada	PCV-2a	Meehan et al.(1998)
AF109399	2-E	Canada	PCV-2a	Hamel et al.(2000)
AF154679	nd	Taiwan	PCV2-2a / 2B	Kuo et al. (1999)
AF117753	2-D	Canadá	PCV-2a	Hamel et al. (2000)
AF201307	GER3	Germany	PCV-2a / 2C	Mankertz et al.(2000)
AF201309	SPA2	Spain	PCV-2a	Mankertz et al.(2000)
AF364094	nd	Taiwan	PCV-2a	Wang et al.(2001)
AF381175	BF	China	PCV-2a	Lu et al.(2001)
AY180397	Pingtung-5	China	PCV-2a	Liao et al. (2002)
AY256459	336	Hungary	PCV2-2a 2C	Dan et al.(2003)
AY321982	Fh14	France	PCV-2b	de Boisseson et al.(2004)
AY321983	Fh20	France	PCV-2b	de Boisseson et al.(2004)
AY321984	Fd3	France	PCV-2b	de Boisseson et al.(2004)
AY322001	Fh21	France	PCV-2b	de Boisseson et al.(2004)
AY484407	NL_Control_1	Netherlands	PCV-2b	Grierson et al.(2004)
AY484412	NL_Control_6	United Kingdom	PCV-2b	Grierson et al.(2004)
AY484415	NL_PMWS_3	United Kingdom	PCV-2b	Grierson et al.(2004)
AY556477	HuNan	China	PCV2- 2b 1C	Zhixin et al. (2004)
AY678532	ZS0401	China	PCV-2b	Zhou et al.(2004)
AY682997	ZC	China	PCV-2b	Wang et al. (2004)
AY691169	QZ0401	China	PCV-2b	Zhou et al. (2004)
AY699793	nd	USA	PCV2-2a 2E	Fenaux et al.(2004)
AY847748	BJW	Singapore	PCV2-2b 1B	Liu et al. (2005)
AY754017	Aust 6	Australia	PCV2-2a 2A	Muhling et al. (2005)
DQ151643	GS	China	PCV-2b	Ma et al. (2005)
DQ220728	FMV05-6317	Canadá	PCV-2b	Tremblay et al. (2005)
DQ220734	FMV05-7389	Canadá	PCV-2b	Tremblay et al. (2005)
DQ220736	FMV05-7537	Canadá	PCV-2b	Tremblay et al. (2005)
DQ220739	FMV05-6302	Canadá	PCV-2b	Tremblay et al. (2005)
DQ233257	ROM	Romania	PCV-2b	Cadar et al.(2007)
DQ629115	n32eu	USA	PCV-2b	Cheung et al. (2007)
DQ629117	k52	USA	PCV-2b	Cheung et al. (2007)
DQ861896	am22	Brazil	PCV-2b	Castro et al. (2006)
DQ861899	am9	Brazil	PCV-2b	Castro et al. (2006)
DQ861902	am21	Brazil	PCV-2b 1A	Castro et al.(2006)

DQ870484	hk102	USA	PCV-2a	Cheung et al. (2007)
DQ923524	15/23R	Brazil	PCV-2b	Dezen et al. (2010)
EF524517	GS04	China	PCV-2d	Wang et al. (2009)
EF524526	LN05	China	PCV-2e	Wang et al. (2009)
EF524533	GX0602	China	PCV-2e	Wang et al. (2009)
EF524539	TJ06	China	PCV-2d	Wang et al. (2009)
EU057185	P0404c/03	Brazil	PCV-2b	Esteves et al.(2007)
EU148503	DK1980PMWSfree	Denmark	PCV-2c	Dupont et al. (2008)
EU148505	DK1990PMWSfree	Denmark	PCV-2c	Dupont et al. (2008)
EU186062	Chile C	Chile	PCV-2b	Bucarey et al. (2007)
EF394775	05-22779	Canada	PCV2 –2a 2E	Tremblay et al. (2007)
EU519223	Chile-I	Chile	PCV-2b	Bucarey et al. (2007)
EU747125	PCU1	Korea	PCV-2a	Vijayachandran et al. (2008)
EU755378	BRA9	Brazil	PCV-2b	Chiarelli-Neto et al.(2009)
EU980087	isolate 5	Argentina	PCV-2b	Pereda et al. (2008)
EU980092	isolate 11	Argentina	PCV-2b	Pereda et al. (2008)
EU980093	isolate 11	Argentina	PCV-2b	Pereda et al. (2008)
FJ233907	SoPCV2b	Canadá	PCV-2b	Chaiyakul et al. (2008)
FJ475129	BJ-1	China	PCV1	Zhou et al.(2008)
FJ905463	C7155	Korea	PCV-2b	Kim et al.(2009)
FJ905471	C7189	Korea	PCV-2a	Kim et al.(2009)
FN398024	Villa Clara V2	Cuba	PCV-2b	Perez et al., (2010)
FN398025	Villa Clara V2	Cuba	PCV-2b	Perez et al., (2010)
FN398026	Villa Clara V2	Cuba	PCV-2b	Perez et al., (2010)
GQ404852	MN614	USA	PCV-2b	Li et al.(2010)
GU049341	Sp-10-7-54-13	Spain	PCV-2b	Fort et al, 2010
GU049342	Sp-10-7-54-13	Spain	PCV-2b	Fort et al, 2010
JN644769	SeUy1	Uruguay	PCV-2b	Ramos et al.(2010)
JN644770	SeUy2	Uruguay	PCV-2b	Ramos et al.(2010)
JN644771	SeUy3	Uruguay	PCV-2b	Ramos et al.(2010)

nd= no determinado

3. Caracterización molecular y biológica de aislamientos de campo del PCV2 en lechones privados de calostro

Abstract

Two field viral isolates from herds located in different regions were obtained. Sequence analysis showed that these strains belonged to porcine circovirus 2 (PCV2) genotype PCV2b.

Five, colostrum-deprived piglets were inoculated IN and IM with PCV2, originally isolated from a pig affected with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). All the infected animals appeared clinically normal. Macroscopic lesions were mainly observed in lymph nodes and the histological analysis confirmed the presence of lesions in lungs, and lymphoid tissue. Serum conversion occurred between 21 and 29 days post-infection.

Isolation for the first time of PCV2 virus from tissues of swine intensive production systems in Colombia along with experimental infection and demonstration of virus presence contributes greatly to the knowledge and understanding of PMWS syndrome.

Keywords: Porcine circovirus; virus isolation; experimental infection, genotyping

Introducción

El circovirus porcino (PCV) fue descrito por primera vez por Tischer et al. (2004) como un contaminante permanente de la línea celular proveniente del riñón de células porcinas PK15 (ATCC CCL-33). Mediante la marcación radiactiva seguida de un método de centrifugación con CsCl (cloruro de cesio) y debido a su tamaño, los investigadores caracterizaron el genoma inicialmente como un virus ARN semejante a los picornavirus. Posteriormente, el mismo grupo de investigadores publicó un estudio acerca de la caracterización de un pequeño virus, sin envoltura, de forma icosaédrica, formado por un cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico (ADN) el cual denominaron como circovirus porcino (Tischer et al., 1982).

La secuencia completa del PCV1, formada por 1759 pares de bases se publicó por primera vez en 1985 (Buhk et al., 1985), confirmada posteriormente por otros grupos de investigadores en Irlanda (Meehan et al., 1997) y en Estados Unidos (Niagro et al., 1998). Otros aislamientos del PCV1 se han obtenido a partir de materia fecal de porcino (Allan et al., 1995) y en Francia de cerdos afectados por el Síndrome Multisistémico de Emaciación Post-destete (PMWS) (LeCann et al., 1997). Recientemente, el PCV1 ha ganado notoriedad debido a su presencia como contaminante en las vacunas vivas humanas (Baylis et al, 2011) y su capacidad de producir lesiones pulmonares en fetos de cerdas infectadas a los 55 días de gestación (Saha et al., 2011).

A inicios de los años 90, se presentó en una granja de ciclo completo ubicada en el noreste de Canadá, un brote de enfermedad caracterizado por la muerte súbita de los porcinos y alta mortalidad. A pesar de las investigaciones diagnósticas realizadas, no fue posible identificar ninguno de los patógeno porcinos conocidos hasta el momento. En 1996, durante la reunión de la Asociación Canadiense de especialistas en porcinos se describió una nueva enfermedad del cerdo que afectaba animales del destete y crecimiento,

caracterizada por la pérdida de peso, linfadenopatía, signos respiratorios, enteritis e ictericia, denominada por Harding(1996) y Clark (1996) como el síndrome multisistémico de emaciación postdestete (PMWS). Casi de forma simultánea, la enfermedad fue descrita en Estados Unidos (Daft et al., 1996) y en Francia (Albina et al., 1996).

Al mismo tiempo, investigadores de Canadá, trabajando en colaboración con colegas del norte de Irlanda aislaron y caracterizaron una nueva cepa del PCV denominada cepa Saskatoon (ahora conocida como Stoon) obtenida a partir de tejidos de cerdos con PMWS (Ellis et al., 1998). Luego, mediante el desarrollo de un panel de anticuerpos monoclonales para el PCV1 (Allan et al., 1998a) se establecieron las diferencias antigénicas entre el circovirus contaminante de la línea celular PK15 y el nuevo circovirus detectado en Canadá. Otros aislamientos del nuevo circovirus a partir de tejidos de cerdos con PMWS se reportaron posteriormente en Estados Unidos y Europa (Allan et al., 1998a) y luego en 1998, se propuso la nomenclatura genérica PCV2, para designar estos nuevos circovirus aislados de porcinos con PMWS (Allan et al., 1998b).

El PMWS ha sido descrito a nivel mundial y actualmente es considerado como una de las enfermedades de mayor impacto económico sobre la industria porcina. En Colombia, la enfermedad fue detectada en el 2007 mediante estudios serológicos nacionales y pruebas de inmunohistoquímica realizadas en tejidos de porcinos afectados con el PMWS, en granjas de producción intensiva localizadas en diferentes zonas del país (Clavijo *et al.*, 2007). El presente trabajo tuvo como objetivo realizar el primer aislamiento y caracterización en Colombia del PCV2 obtenido de animales afectados con PMWS así como la evaluación de su patogenicidad a través de un estudio de infección experimental en lechones privados de calostro.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Colección de las muestras

La colección de muestras se realizó en dos granjas porcinas comerciales localizadas en los departamentos del Valle del Cauca (granja 37) y Antioquia (granja 22). De cada granja se seleccionaron tres animales de precebo con signos clínicos compatibles con PMWS como pérdida de peso, signos respiratorios y palidez. Las principales lesiones observadas en la necropsia fueron linfadenopatía, neumonía lobar y enteritis aguda. Para los análisis de laboratorio se colectaron muestras de ganglios linfáticos inguinal, submandibular y mesentérico, tonsila, bazo, pulmón, riñón, intestino delgado e hígado de porcinos. Los tejidos colectados para el aislamiento viral se conservaron a -70°C hasta su uso y fueron procesados en el laboratorio de virología animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá.

3.1.2 Aislamiento viral

En el aislamiento viral se siguió el protocolo previamente descrito por Allan et al. (1998a) adaptado a las condiciones del Laboratorio de virología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia. Se utilizaron homogenizados de ganglios linfáticos en una proporción de 10% (peso/volumen) en medio MEM (Gibco 21090-055, USA) con 100 ug/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina, estos fueron congelados y descongelados tres veces y posteriormente centrifugados a 2.500 rpm durante 30 min a 4°C . Una porción de los sobrenadantes filtrados se sometieron a la extracción de ADN y el resto se utilizó para la inoculación de una línea celular PK15 libres de PCV1 y PCV2 con 24 horas de crecimiento. Luego, las células fueron tripsinizadas y se preparó una suspensión de 8×10^4 células/ml en medio de cultivo MEM para crecimiento con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Posteriormente, se mezcló la suspensión celular con los sobrenadantes filtrados

en una relación de 10:1 y se cultivaron a 37 °C con CO₂ al 5% durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con solución salina tamponada (PBS) y tratadas con 300mM de D-Glucosamina (SIGMA G4875-25G) en solución salina basal de Hanks durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, fueron lavadas con PBS, se adicionó medio MEM para crecimiento con 5% de SFB y se dejaron en incubación a 37 °C con CO₂ al 5% durante 48 horas. A los tres días, los cultivos infectados se congelaron y descongelaron tres veces dando como resultado una suspensión que se clarificó por centrifugación a 2.500 rpm por 10 minutos en temperatura de refrigeración.

Después de tres pasajes, la monocapa de células en microplacas de 96 pozos fue evaluada para detectar la presencia del PCV2 mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta en monocapa (IPMA) y una muestra de las suspensiones se examinó por PCR para detección de los circovirus porcinos. En el Anexo 1, se describe el procedimiento para el aislamiento del PCV2 realizado en este estudio.

3.1.3 Técnica de Inmunoperoxidasa en Monocapa

Para monitorear el crecimiento viral, en cada pasaje se realizó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se preparó una microplaca de 96 pozos para la tinción por la técnica de IPMA. Para la tinción de las células infectadas en la microplaca, se siguió el protocolo previamente descrito por Rodríguez-Arriola et al.; 2000 cuyo procedimiento en forma resumida es el siguiente: luego de 72 horas de incubación de las microplacas con cultivos celulares infectados se procedió a retirar el medio de cultivo y las células se lavaron tres veces con 0.01 M de solución salina fosfato bufferada (PBS) con 1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich Cat. P1379, USA). La monocapa de células fue fijada inmediatamente con una solución de metanol (50%) y acetona (50%) durante 20 minutos a -20°C. Posteriormente, se adicionó 50 µl de metanol (J.T.

Baker Cat. 9070-02, México) con peróxido de hidrógeno al 1% (Merck Cat. 7210, Alemania) durante cinco minutos a temperatura ambiente para inhibir las peroxidases endógenas. Luego de tres lavados con PBS conteniendo Tween 20 (1%) y albúmina sérica bovina (1%) (Sigma A 7030-50G) se dispensó en cada pozo 50 µl de un suero policlonal (colectado de un animal infectado de forma natural con título seroneutralizante superior a 1:4096 determinado previamente) diluido a una concentración 1:200 en PBS-Tween 20 (1%).

Posteriormente, las microplacas se incubaron a 37°C durante una hora en cámara húmeda y luego de tres lavados con PBS- Tween 20 (1%)- albúmina sérica bovina (1%), se trataron con 50 µl de proteína A (Sigma Aldrich Cat.P8651, USA) en una concentración de 0,67 µg/ml y se incubaron otra hora a 37°C.Finalmente las placas fueron lavadas tres veces con PBS y puestas en contacto con una solución sustrato (AEC Dako Cytomation Cat. K3469, USA). La lectura se realizó en un microscopio óptico con un aumento de 40X.El procedimiento de esta técnica se describe en el Anexo 2.

3.1.4 PCR para la detección del PCV1

Para la extracción de ADN total se utilizó un kit comercial (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del laboratorio productor. Para la detección del PCV1, se realizó una técnica de PCR convencional usando cebadores previamente descritos por Quintana et al., 2001, que amplifican un fragmento de 194 pares de base (pb). El cebador directo P8 (5'- TTACCGGCGCACTTCGGCAG -3') se ubica entre las posiciones 1776-18 del genoma. El cebador reverso P4 (5'- TTCCAAACCTTCCTCTCCGC 3') se localiza entre las posiciones 203-184 del genoma. La mezcla de la reacción fue optimizada con 200 nM dNTPs, 1.5 mM MgCl, 1x PCR buffer, 500 nM de cada cebador y 0.05 U of GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega Cat. M8298, USA) en un volumen final de 25 µl (Anexo 3).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Bio Rad ALS-1296 (Bio-rad Laboratories, Inc. USA) con el siguiente perfil térmico: denaturación a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, anillamiento de los cebadores a 58 °C por 1 min, extensión inicial a 72 °C por 30 s y extensión final a 72 °C por 7 min. Los fragmentos amplificados fueron visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMACat. A-9539, USA) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen Cat.15581-044, USA). El fragmento de ADN amplificado fue visualizado empleando luz ultravioleta después de la tinción con EZ Vision™ Three (Amresco Cat. N-313, USA). La longitud del producto fue verificada con un marcador estándar de Acido Desoxirribonucleico de 100 pb (Invitrogen Cat.15628-019, USA). En cada reacción se utilizó como control positivo, ADN del PCV1 obtenido del sobrenadante de la línea celular PK15 ATCC CCL-33, las cuales están persistentemente infectadas con este virus.

3.1.5 PCR para la detección del PCV2

Para la detección del PCV2, se realizó una técnica de PCR convencional utilizando los cebadores previamente descritos por Quintana et al., 2002, que amplifican un fragmento de 657 pares de base (pb). El cebador directo PCV7 (5'-GCCAGTTCGTCACCCTTTC-3') se ubica entre las posiciones 940 y 958 del genoma en el ORF1. El cebador reverso PCV17 (5'-CTCCCGCACCTTCGGATAT-3') se localiza entre las posiciones 1578 y 1596 en el ORF2. La mezcla de la reacción fue optimizada con 200 nM dNTPs, 1.5 mM MgCl, 1x PCR buffer, 500 nM de cada cebador y 0.05 U of Taq polymerase (Promega Cat.M8298, USA) en un volumen final de 25 µl (Anexo 4).

La reacción se corrió en el termociclador Bio Rad previamente descrito con el siguiente perfil térmico: denaturación a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, anillamiento de los cebadores a 64 °C por 1

minuto, extensión inicial a 72 °C por 30 segundos y extensión final a 72 °C por 7 minutos. Los fragmentos amplificados fueron visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA Cat.A-9539, USA) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen Cat.15581-044, USA). El fragmento de ADN amplificado fue visualizado empleando luz ultravioleta después de la tinción con EZ Vision™ Three (Amresco Cat.N-313, USA). La longitud del producto fue verificada con un marcador estándar de Acido Desoxirribonucleico de 100 pb (Invitrogen Cat.15628-019, USA). En cada reacción se utilizó como control positivo, ADN obtenido de un virus PCV2 (Número de acceso en el Genbank JF290418) donado por el Dr. Michael Murtaugh de la Facultad de Medicina Veterinaria en la Universidad de Minnesota, Estados Unidos.

3.1.6 Análisis de las secuencias

Para amplificar la secuencia completa del ORF2 se utilizó un par de cebadores específicos para el PCV2 generados con base en el genoma completo de la cepa ZhuJi2003 (AY579893). El cebador directo (capFw 5'-CCGTTGGAATGGTACTCCTC-3') se ubica en las posiciones 825 y 844 del genoma en el ORF1 y el cebador reverso (capRw 5'-ACAGCGCACTTCTTTCGTTT-3') se localiza entre las posiciones 1760 – 1741 en el ORF2. Estos cebadores amplifican un producto de 935 pb. La reacción se corrió en el termociclador descrito previamente empleando el siguiente perfil térmico: un ciclo at 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, anillamiento de los cebadores a 57 °C por 45 s, extensión inicial a 72 °C por 45 s y extensión final a 72 °C por 12 min (Anexo 5). Los fragmentos amplificados fueron visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA Cat. A-9539, USA) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen Cat. 15581-044, USA). El fragmento de ADN amplificado fue visualizado empleando luz ultravioleta después de la tinción con EZ Vision™ Three (Amresco Cat. N-313, USA). La longitud del producto fue

verificada con un marcador estándar de Ácido Desoxirribonucleico de 100 pb (Invitrogen Cat.15628-019, USA).

El amplificado de ADN fue purificado utilizando un kit comercial de purificación (Qiagen Cat. 28706, USA) y la calidad de la preparación fue verificada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. La secuenciación se realizó en un laboratorio externo (Macrogen, USA) empleando los mismos cebadores de la PCR. Para la revisión de las secuencias se utilizó el programa Bio-Edit para Windows® versión 7.0.9, IBIS BIOSCIENCES, USA (Hall, 1999). Posteriormente, las secuencias fueron alineadas utilizando ClustalW y los análisis de homología se realizaron con BLAST (Altschul et al., 1997). La relación filogenética fue realizada con MEGA v.5.0 (Tamura et al., 2007) y los árboles filogenéticos fueron contruidos utilizando una secuencia de nucleótidos de 702 pb correspondiente al ORF2 que codifica para de la proteína de la cápside del PCV2 de acuerdo con los parámetros de Neighbor-Joining con 1.000 réplicas *bootstraps*. Como grupo externo se empleó la secuencia FJ475129 del PCV1.

3.1.7 Reproducción experimental de la infección

La reproducción experimental de la infección se realizó en lechones privados de calostro obtenidos de una piara comercial de ciclo completo en la cual no se presentaba problemas signos clínicos compatibles con PMWS. Previamente se realizó un chequeo serológico para confirmar la ausencia de enfermedades virales como el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) y la enfermedad de Aujeszky. En la granja se vacunaba contra Peste porcina de acuerdo al programa nacional de erradicación: lechones a los 50 días de edad y las cerdas en la primera semana post-parto. Para la realización del estudio se seleccionaron diez lechones de una misma camada con un peso superior a 1.100 gr, de los cruces Yorkshire x Pietran x Hampshire, los cuales fueron transportados en un periodo de dos horas post-nacimiento a una unidad de aislamiento del Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios (LANIP) del Instituto Colombiano

Agropecuaria (ICA), allí fueron alojados en un mismo módulo con temperatura controlada, en un ambiente higiénico pero no estéril.

Durante las dos primeras semanas de vida, los animales fueron alimentados con un lactoreemplazador preparado con leche de origen ovino (PIGLAC, Liptosa, Lipidos Toledos S. A., España) durante una semana y luego recibieron un preiniciador comercial (INITEC, Grupo NUTEC, México) en pellet por una semana más (Figura 1a). Todos los animales fueron tratados con 200 mg de hierro intramuscular a los tres días de edad (Cerdex 100, Fort Dodge) y recibieron un tratamiento antibiótico inyectable durante los primeros tres días con Ceftiofur clorhidrato (Tiofur, Chalver Laboratorios, 3.0 – 5.0 mg/Kg de peso) seguido del tratamiento oral con Sulfato de colistina (5mg/kg) durante dos semanas.

Para la infección experimental de los lechones se utilizó un aislado colombiano obtenido de un brote de PMWS ocurrido en una granja comercial ubicada en el departamento del Valle. A los ocho días de edad solo sobrevivieron cinco animales, los cuales fueron utilizados para la realización de la infección experimental. Tres lechones identificados como No.1, 2 y 3 de (Grupo experimental), fueron inoculados con el virus PCV2 de origen colombiano (CO3709) con un título de $10^{6.7}$ TCID₅₀ / ml, por las vías intranasal (1 ml por cada narina) y 2 ml por la vía intramuscular en la tabla del cuello. Para tranquilizar los animales, los lechones fueron previamente inyectados con Azaperona (Stresnil, Janssen Pharmaceutica 2 mg/Kg) y para la inoculación intranasal se empleó una sonda pediátrica urinaria impregnada con lidocaína clorhidrato (Roxicaina Jalea 2%, Ropsohn Therapeutics Ltda). Los lechones No. 4 y No. 5, no se infectaron y fueron sacrificados el mismo día de la inoculación (Grupo control negativo). El ensayo se realizó de acuerdo con las directrices establecidas por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia.

El estado de salud y la temperatura corporal fueron monitoreados diariamente. Adicionalmente, se colectó muestras de hisopados nasales y de sangre a nivel de

la vena cava craneal en los siguientes tiempos: al nacimiento, antes de la infección (día 0) y a los 8, 15, 21 y 30 días postinfección (dpi) (Figura 1b). Al final del ensayo (30 dpi) se realizó la eutanasia a todos los lechones del grupo experimental y se colectaron muestras de diferentes tejidos para análisis histopatológico y para pruebas moleculares.

Figura 1. Reproducción experimental de la infección por PCV2 en lechones comerciales privados de calostro. Imagen a: alimentación artificial de los lechones. Imagen b: colección de hisopados nasales en un lechón recién nacido.



3.1.7.1 Análisis serológico

Los sueros recolectados fueron transportados a 4°C hasta ser centrifugados y luego se almacenaron a - 20°C para ser luego procesados. Para determinar la presencia de anticuerpos contra PCV2 se utilizó una prueba de ELISA de bloqueo comercial (SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking SYNBIOTICS Corp. Francia) siguiendo el protocolo del fabricante, considerando una muestra positiva si la relación muestra: positivo (S/P) era menor de 0.5 y negativo si era mayor a este valor.

3.1.7.2 Análisis histopatológico

Las muestras de tejidos (ganglios linfáticos, bazo, pulmón, hígado y riñón) se fijaron en formalina tamponada al 10% y posteriormente se procesaron por la técnica de

inclusión en parafina y se colorearon con hematoxilina-eosina según la técnica estandarizada en el laboratorio de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, para luego realizar su evaluación histopatológica. La evaluación y clasificación de las lesiones asociadas a PMWS fue realizada por un mismo patólogo quien categorizó los cambios observados de 0 a 3 de acuerdo con la severidad de las lesiones, de acuerdo con la metodología previamente descrita por Chianini et al, 2003.

Los criterios de calificación fueron los siguientes:

Tejido linfoide (ganglio linfático y/o bazo):

Grado 0: No se observa lesión

Grado 1: Leve depleción linfoide en áreas B, leve infiltración de histiocitos.

Grado 2: Moderada depleción linfoidea en áreas B y T y moderada infiltración de histiocitos. Presencia de células gigantes multinucleadas (CGMs) y presencia de cuerpos de inclusión virales intra-citoplasmáticos en histiocitos y CGMs. Áreas focales de necrosis de coagulación en los centros germinales.

Grado 3 Severa depleción linfoidea en áreas B y T, severa infiltración de histiocitos y focos de necrosis de coagulación en centros germinales. Presencia de células multinucleadas. Presencia de cuerpos de inclusión viral intracitoplasmáticos en histiocitos y CGMs

Pulmón:

Grado 0: No se observa lesión.

Grado 1: Leve engrosamiento multifocal del septo alveolar por la presencia de macrófagos, histiocitos, linfocitos y algunas células plasmáticas.

Grado 2: Moderado engrosamiento multifocal del septo alveolar por la presencia de macrófagos, histiocitos, linfocitos y algunas células plasmáticas. Leve exudación de polimorfonucleares, en luz de bronquios, bronquiolos y alvéolos. Incremento en el número de macrófagos alveolares. Hiperplasia de neumocitos tipo 2.

Grado 3. Severo engrosamiento del septo alveolar debido a la presencia de macrófagos, histiocitos, linfocitos, y algunas células plasmáticas. Moderado infiltrado polimorfonuclear en bronquios, bronquiolos y alvéolos. Pérdida del tejido linfoide asociado a bronquiolo (BALT). Hiperplasia de neumocitos tipo 2. Presencia de inclusiones virales en histiocitos.

Hígado:

Grado 0: No se observa lesión.

Grado 1: Agregados multifocales de linfocitos y células plasmáticas.

Grado 2: Moderada distribución multifocal en áreas portales de infiltrado linfoplasmocítico y necrosis individual de hepatocitos.

Grado 3: Infiltrado multifocal linfoplasmocítico en áreas portales y perilobulillar.

Degeneración de hepatocitos. Necrosis masiva de hepatocitos. Fibrosis perilobulillar.

Riñón:

Grado 0: No se observa lesión

Grado 1: Leves agregados multifocales de infiltrado linfoplasmocitario.

Grado 2: Moderado infiltrado multifocal linfoplasmocítico y algunos histiocitos en corteza y médula.

Grado 3: Severo infiltrado multifocal linfoplasmocítico y moderada presencia de histiocitos en médula y corteza. Área de fibrosis.

3.1.7.3 Análisis Inmunohistoquímico

Para la identificación del antígeno viral en los cortes de tejido se realizó una técnica inmunohistoquímica (IHQ) de acuerdo con el protocolo establecido por el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Iowa- Estados Unidos, normalizado por el laboratorio de patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. En este protocolo, se empleó

un anticuerpo primario AntiPCV2-policlonal desarrollado en conejo adquirido en la Universidad de Iowa, Estados Unidos (Anexo 6). La cantidad de antígeno viral presente en los tejidos evaluados, se clasificó como ausente, leve, moderado o severo en una escala cualitativa como leve (+), moderada(++) o severa (+++) de acuerdo con los criterios previamente establecidos por Segalés et al., 2010.

3.1.7.4 PCR para la detección del PCV1 y PCV2

Las muestras de suero y tejidos (ganglios linfáticos, pulmón, tonsila, bazo e hígado) conservadas a -70°C, fueron utilizadas para la detección del PCV1 y el PCV2 en los lechones de los grupo control y experimental. Para la obtención del Acido Desoxirribonucleico (ADN) viral a partir del suero, se utilizó el kit de extracción comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) utilizando 200 µl de suero y 20 mg de homogenizado de ganglios linfáticos y homogenizado de los demás tejidos, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del kit.

Para la detección del PCV1 se utilizaron los cebadores previamente descritos por Quintana et al., 2001 y para la detección del PCV2 se emplearon los cebadores publicados por Quintana et al., 2002, siguiendo los protocolos descritos en los Anexos 3 y 4.

3.2 Resultados

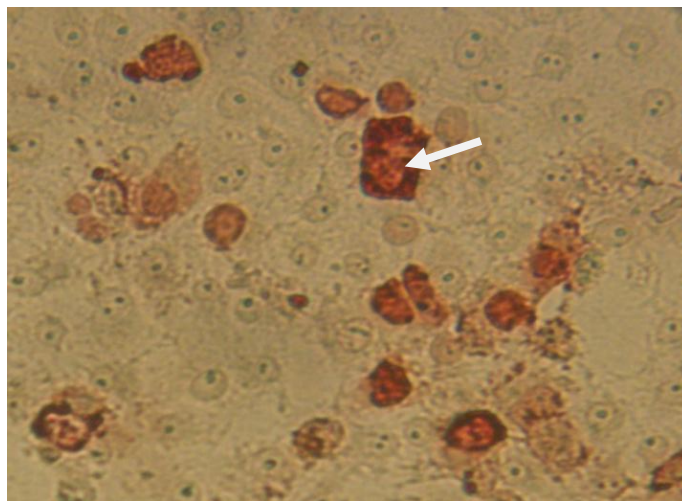
3.2.1 Aislamiento del PCV2

Mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta en monocapa, se lograron confirmar dos aislamientos del PCV2 en células PK15, a partir de homogenizados de ganglios linfáticos porcinos obtenidos de dos animales de precebo que presentaban manifestaciones clínicas y lesiones a la necropsia compatibles con PMWS. El aislamiento designado como CO2209 se obtuvo de un porcino de 9 semanas de edad procedente de una granja porcina intensiva localizada en el departamento de Antioquia. El aislado CO3709 se obtuvo de lechón con 6 semanas de edad de una

explotación ubicada en el departamento del Valle.

La coloración positiva por IPMA fue evidenciada tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células infectadas (Figura 2). Las evidencias de los aislamientos se obtuvieron a partir del pasaje número tres, sin embargo fue necesario realizar seis pasajes más para obtener un título viral de $10^{-6.7}$ Log₁₀ TCID₅₀ para el aislado CO3709 y de $10^{-5.2}$ Log₁₀ TCID₅₀ para el aislado CO2209.

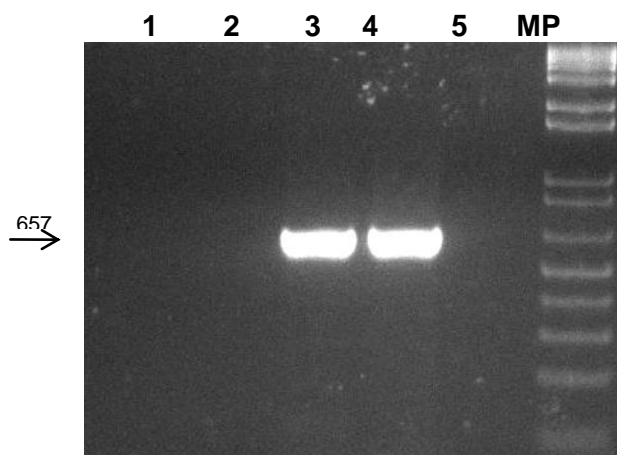
Figura 2. Detección del PCV2 por inmunohistoquímica en células PK15 (La flecha blanca indica células infectadas con el aislamiento C03739). 400X



3.2.2 Detección por PCR del PCV1 y PCV2

La evaluación de las suspensiones celulares obtenidas en cada pasaje a través de la PCR- PCV2, permitió evidenciar a partir del segundo pasaje la presencia del virus en los cultivos celulares PK15 infectados con las suspensiones de ganglios linfáticos mediante la visualización de una banda de 657 pb en los geles de electroforesis (Figura 3). Por otro lado, los cultivos fueron negativos para el PCV1 por PCR.

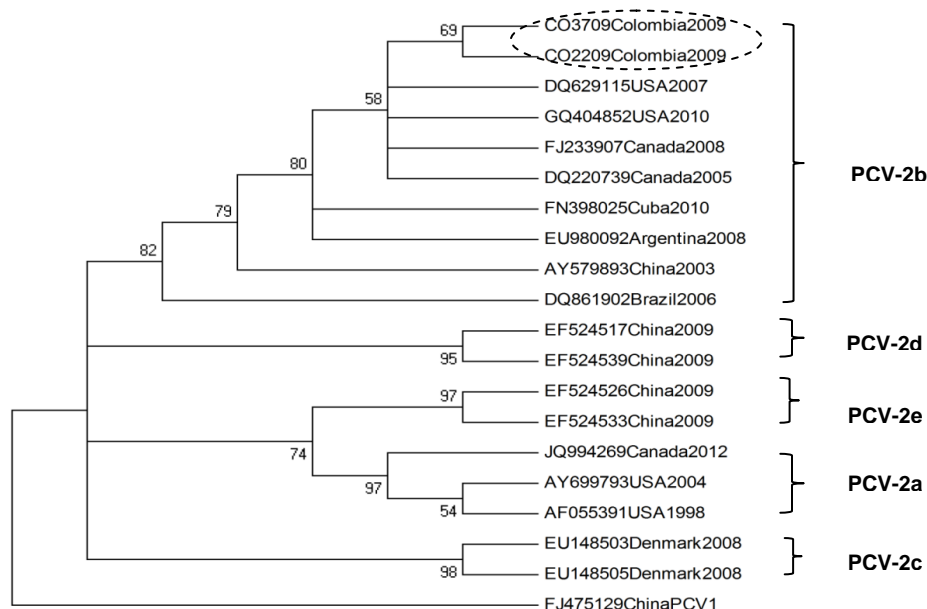
Figura 3. Detección del PCV2 por PCR convencional. Líneas 1 y 2: muestras negativas PCV2, 3: aislado PCV2 CO3739, 4: aislado PCV2 CO2239, 5: control negativo, MP: marcador de peso molecular ADN 100



3.2.3 Clasificación filogenética de los aislamientos PCV2

Los resultados de la secuenciación, permitieron clasificar los aislamientos CO2209 y CO3709 dentro del genotipo PCV2b, de acuerdo con el modelo de clasificación propuesto por Olvera *et al.*, 2007 (Figura 4).

Figura 4. Análisis filogenético de dos aislamientos colombianos de PCV2 de los departamentos del Valle y Antioquia y otras secuencias reportadas en el GenBank, basadas en la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de la cápside. El árbol fue construido utilizando el algoritmo de neighbor-joining en MEGA 5.0. El óvalo resalta los dos aislamientos colombianos CO3709 y CO2209



3.2.4 Reproducción experimental de la infección

3.2.4.1 Observaciones clínicas y lesiones macroscópicas a la necropsia

Los tres lechones experimentalmente infectados desarrollaron diarrea leve o severa dentro de los primeros ocho dpi. El lechón No.3 fue sacrificado a los 5 días post-infección debido a la mala condición de salud. De este animal, se aisló una cepa de *Escherichia coli* serotipo F41 a partir de muestras de intestino delgado. Los animales recibieron un tratamiento inyectable (Baytril, enrofloxacin 2,5 mg/Kg) durante tres días. Aparte de estas manifestaciones tempranas de enteritis bacteriana, no se observó otros signos clínicos en los animales ni se observaron variaciones significativas en la temperatura corporal.

En la necropsia de los lechones del grupo control (0 dpi) no se encontraron lesiones asociadas al PMWS. Los dos lechones experimentalmente infectados que fueron sacrificados al final del ensayo (30 dpi), presentaron moderado aumento de tamaño (leve a severo) de los ganglios linfáticos axilares, inguinales, preesternales y mesentéricos; ausencia de colapso pulmonar, los riñones estaban pálidos, aumentados de tamaño y con algunas hemorragias superficiales y en un lechón era evidente la congestión a nivel hepático. Estas lesiones se asociaron con infección sistémica por el PCV2.

3.2.4.2 Lesiones histopatológicas

Las lesiones microscópicas encontradas en los tejidos de los lechones de los grupos control y experimental se resumen en la tabla 1. En todos los lechones del grupo experimentalmente infectado, se observaron lesiones en diferentes tejidos de variable severidad compatibles con PMWS, siendo más severas en ganglios linfáticos (Figura 5). En uno de los lechones del grupo control se evidenció ligera depleción linfocítica en intestino y bazo (0 dpi).

En los lechones afectados, los resultados para cada lesión se calificaron de

acuerdo con su severidad como: grado 0, grado 1, grado 2, y grado 3 según la escala de Chianini et al., 2003.

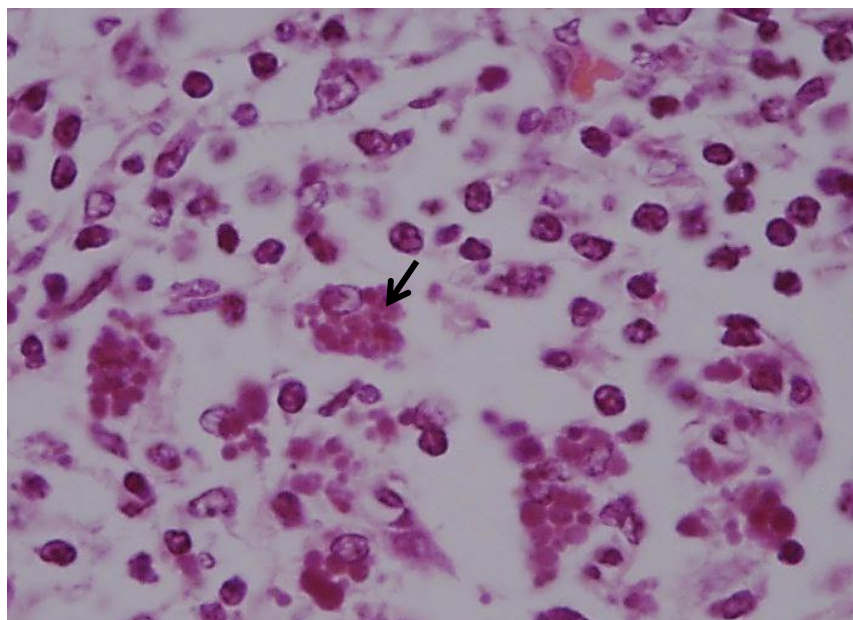
Tabla 1. Calificación de la lesión histopatológica observada en diferentes tejidos

Órgano	Grupo experimental			Grupo control	
	Lechón 1	Lechón 2	Lechón 3†	Lechón 4	Lechón 5
Ganglios linfáticos	3	1	2	0	0
Pulmón	1	1	0	0	0
Bazo	2	1	0	0	0
Tonsila	2	1	1	0	0
Riñón	0	1	0	0	0
Corazón	0	0	0	0	0
Higado	1	1	0	0	0
Intestino	1	1	0	1	0

†: Eutanasia a los 5 días post-infección

Los resultados de histopatología se clasificaron según su severidad en grado 0, grado 1, grado 2 y grado 3 (Chianini et al., 2003)

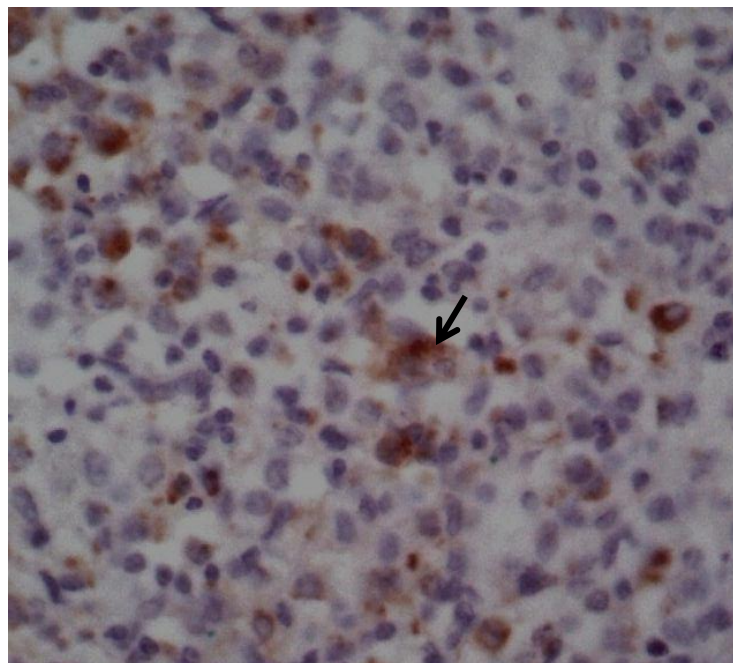
Figura 5. Ganglio linfático inguinal del lechón No. 1 infectado por el virus PCV2 CO3709 a los 30 dpi. Notese los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en células histiocitarias (flecha). H&E 400X.



3.2.4.3 Detección del PCV2 por PCR

La PCR convencional realizada en las muestras de suero, hisopos nasales y pool de tejidos obtenidas de los lechones inoculados con el aislado PCV2 CO3739 SE demostró infección de los animales a los 8 dpi en suero, en hisopos nasales a los 15 dpi y en ganglios linfáticos al final del ensayo. En las muestras del control colectadas el día 0, los resultados fueron negativos (Tabla 2). Por otro lado, mediante la tinción inmunohistoquímica realizada en los tejidos de los lechones infectados experimentalmente se demostró la presencia del antígeno viral en todos los tejidos evaluados (Tabla 2), sin embargo, la cantidad de células con marcación positiva fue mayor en los tejidos linfoides (Figura 6). En los tejidos de los lechones control no se evidenció la presencia del virus.

Figura 6. Lechón No. 1. Microfotografía del ganglio linfático mesentérico. Identificación del antígeno viral en el citoplasma de los macrófagos (color rojo) por medio de la prueba de IHQ (flecha). Lesión moderada 2. 400X



3.2.4.4 Evaluación serológica

Ninguno de los lechones infectados experimentalmente presentaba anticuerpos frente al PCV2 antes de la infección experimental. En el grupo de lechones inoculados se demostró seroconversión entre los 15 y 21 dpi y permanecieron seropositivos hasta el final del estudio (Tabla 3).

Tabla 2. Detección del PCV2 por PCR convencional y tinción inmunohistoquímica en muestras de suero y tejidos de animales experimentalmente infectados con el aislado PCV2 CO3709

Grupo experimental	Lechón No.	dpi	PCR			IHC					
			Suero	Hisopo nasal	Tejidos linfoides	Ganglios linfáticos	Bazo	Tonsila	Hígado	Pulmón	Intestino (Placas de Peyer)
PCV2 CO3739	1	0	neg	neg							
		8	pos	pos							
		15	pos	pos							
		21	pos	pos							
		30	pos	pos	pos	+++	++	++	+	+	+
	2	0	neg	neg							
		8	pos	pos							
		15	pos	pos							
		21	pos	pos							
		30	pos	pos	pos	++	+	+	-	+	+
	3†	0	neg	neg	neg						
Control	4	0	neg	neg	neg	-	-	-	-	-	-
	5	0	neg	neg	neg	-	-	-	-	-	-

†:Eutanasia a los 5 días post-infección. Los resultados de la IHC para cada órgano se calificaron de acuerdo con la cantidad células con inmunomarcación severidad como: negativo (-), leve (+), moderada (++) y severa (+++).

Tabla 3. Detección de anticuerpos frente al PCV2 por ELISA en muestras de suero de lechones experimentalmente infectados.

Grupo experimental	Lechón No.	0 dpi	8 dpi	15dpi	21 dpi	30 dpi
Infectado PCV2 CO3709	1	0,851	0,762	0,271	0,274	0,279
	2	0,927	0,723	0,724	0,276	0,275
	3	0,919	NR	NR	NR	NR
Grupo control	4	0,893	NR	NR	NR	NR
	5	0,914	NR	NR	NR	NR

Los resultados de la ELISA SERELISA® PCV2 Ab, Synbiotics, (Método cualitativo) en suero se calificaron de acuerdo el coeficiente S/N: ≤ 0.4 positivo, > 0.4 negativo.
NR: no realizado

3.3 Discusion

Las primeras evidencias serológicas sobre la presencia del PCV2 en las granjas intensivas de Colombia se conocieron hasta el año 2007 (Clavijo et al., 2007), sin embargo, este es el primer reporte de aislamiento viral y de análisis genético de algunas cepas del PCV2 en el país.

El PCV2 se replica in vitro en las células epiteliales de riñón porcino (Allan et al., 1999, Meehan et al., 1998, Misinzo et al., 2007) y en forma rutinaria, el aislamiento o producción del PCV2 es realizado en líneas celulares de origen porcino como PK15, SK, VR1BL (Allan et al., 1999, Dvorak et al. 2013, Rovira et al., 2002). En el presente estudio, las células PK15 inoculadas con suspensiones de ganglios linfáticos tratadas con 300 mM de D-glucosamina no presentaron ningún efecto citopático después de tres pasajes. Sin embargo, los análisis de

PCR e inmunohistoquímica realizados en las células inoculadas con suspensiones de ganglios linfáticos, mostraron la presencia del ADN viral. Como en otros estudios (Rosell et al., 2000), se pudo demostrar que los ganglios linfáticos de animales infectados por el PCV2 pueden utilizarse como muestras de primera elección no solo para la detección del agente por PCR sino para pruebas de aislamiento viral debido a la alta carga viral normalmente presente en estos tejidos.

El aislamiento de PCV2 a partir de muestras de porcinos con pérdida de peso y deficiente condición corporal, así como la demostración del antígeno y el ácido nucleico del PCV2 en asociación con las lesiones, apoya el diagnóstico de PCV2 como agente etiológico de PMWS en la población porcina de Colombia y soporta la hipótesis de participación del PCV2 como agente etiológico del síndrome de emaciación postdestete en porcinos (Segales et al., 1997; Allan et al., 1998a; Ellis et al., 1998).

Actualmente, la infección sistémica por el PCV2 es considerada como una enfermedad multifactorial en la cual un factor indispensable es la presencia de PCV2, pero la existencia de otros factores de riesgo en la granja determinan la severidad en la expresión clínica del PMWS (Alarcon et al., 2011). Por otro lado, la negatividad de los aislamientos en cerdos de la misma granja podría explicarse por la ausencia del antígeno en los tejidos examinados debido a la etapa de la enfermedad o la presencia de otros patógenos que ocasionan también pérdida de peso y retraso en el crecimiento en los cerdos (Allan et al., 1998; Ellis et al., 1998; Kuipel et al., 1998).

El análisis del ORF2 completo de los dos aislamientos colombianos, mostró una identidad en la secuencia de nucleótidos del 100%. Desde el punto de vista genético ambas cepas estaban estrechamente relacionadas a pesar de tener diferente origen geográfico, lo cual podría relacionarse con una fuente común de animales de reemplazo o semen sin embargo, esta hipótesis no pudo ser

confirmada en el presente estudio. El análisis filogenético de cepas de PCV2 ha demostrado que a nivel de intra-grupos la identidad en la secuencia de nucleótidos es alta (Allan et al., 1998a; Meehan et al., 1998) lo cual coincide con lo detectado en el presente estudio.

Por otra parte, los dos virus PCV2 colombianos pertenecen al genotipo b, de acuerdo con la clasificación propuesta por Olvera et al., 2007 y están próximos a cepas de Canadá y Estados Unidos reportados durante los años 2005 – 2010. Teniendo en cuenta que la mayor parte de los cerdos importados al país provienen de estos países, este podría ser el principal origen de los virus PCV2 circulantes en Colombia.

La detección de virus PCV2b se ha relacionado con la ocurrencia de brotes que causan graves pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial (Lohse et al., 2008; Carman et al., 2008) por lo cual se consideran potencialmente más virulentos que el genotipo PCV2a, sin embargo las variaciones genéticas entre los cinco genotipos descritos hasta el momento (Wang et al, 2009) no explican las variaciones patogénicas y clínicas observadas en el campo y se acepta que independientemente del genotipo, el PCV2 puede causar tanto infecciones clínicas como subclínicas en poblaciones porcinas infectadas.

Los modelos biológicos son ampliamente utilizados para la caracterización patogénica de agentes virales como el PCV2, pero hasta el momento, ha sido difícil establecer un modelo universal para la reproducción experimental del PMWS en porcinos. La reproducción experimental de la infección por PCV2 se ha realizado en cerdos gnotobioticos (Ellis et al., 1999; Krakowka et al., 2000), en lechones libres de patógenos específicos (SPF) (Magar et al, 2000), en lechones privados de calostro (Allan et al., 1999, 2000; Bolin et al, 2001), en lechones obtenidos por cesárea y privados de calostro (Okuda et al, 2003) y en lechones

convencionales (Balasch et al., 1999; Reynaud et al., 2000). Se ha demostrado que las condiciones de los estudios como: tipo de animales, edad de infección, dosis del inóculo, cepa o genotipo, coinfección con otros patógenos porcinos, determina las variaciones en la expresión clínica y patológica del PMWS en animales inoculados (Tomas et al., 2008).

Algunos estudios han reportado la inducción del PMWS mediante la infección únicamente con el PCV2 (Bolin *et al.*, 2001; Okuda et al., 2003; Lager et al., 2007); sin embargo, los resultados más exitosos en cuanto a la manifestación de signos clínicos característicos del PMWS se han obtenido en ensayos de coinfección del PCV2 con otros patógenos de los porcinos tales como el parvovirus porcino (Allan et al., 1999, 2003; Krakowka et al., 2000; Kim et al., 2003; Opriessnig et al., 2004a; Hasslung et al., 2005), el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (Allan et al., 2000b; Harms *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002; Opriessnig *et al.*, 2006c), el *Mycoplasma hyopneumoniae* (Opriessnig *et al.*, 2004b), o mediante el uso de sustancias inmunomoduladores (Krakowka et al., 2001, 2002; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Grasland et al., 2005).

En el presente estudio, no se observaron manifestaciones clínicas típicas del PMWS en lechones privados de calostro, infectados a los ocho días de edad con una dosis de $10^{6.7}$ TCID₅₀ / ml, por las vías intranasal e intramuscular. En otros estudios experimentales tampoco se observaron signos clínicos de PMWS en lechones infectados con el PCV2 (Allan et al., 2000a; Loizel et al., 2005; Ostanello et al., 2005; Opriessnig et al., 2006a, c,d; Fernandes et al., 2007; Fort et al., 2008). Igualmente, en un estudio realizado lechones obtenidos por cesárea, privados de calostro (CDCD) inoculados a las 8 semanas de edad ninguno de los lechones infectados desarrollaron PMWS (Pogranichnyy et al., 2000). No obstante, los resultados del metanálisis de 44 estudios de reproducción experimental publicados y no publicados en la literatura internacional (Tomas et al., 2008), permitieron establecer que los protocolos de mayor éxito en la reproducción experimental del PMWS se obtienen infectando lechones privados de calostro

con menos de tres semanas empleando una alta dosis viral en el inóculo.

A pesar de que los lechones inoculados experimentalmente no manifestaron signos clínicos compatibles con PMWS, cuando se practicó la necropsia a los 30 dpi, se observó un aumento moderado en el tamaño de los ganglios linfáticos superficiales y profundos así como ausencia de colapso pulmonar y riñones ligeramente aumentados de tamaño comúnmente observado en animales infectados con el PCV2. Así mismo, mediante la técnica de inmunohistoquímica se pudo evidenciar la presencia del antígeno asociado a las lesiones histopatológicas presentes en los tejidos de los lechones inoculados. Igualmente, se encontraron diferencias cualitativas en la severidad de las lesiones y distribución del antígeno viral entre los animales y los diferentes tejidos analizados.

Por otro lado, en el suero y en los hisopos nasales se detectó el ADN viral a partir de los 8 dpi y en los tejidos a los 30 dpi. La detección del PCV2 en los hisopos nasales indica infección y eliminación del virus esto último es muy importante ya que puede constituir una fuente de infección para porcinos no infectados. Adicionalmente la detección del virus en los tejidos a los 30 dpi indica la capacidad del aislamiento C03709 de producir infecciones persistentes. En un estudio de infección experimental (Okuda et al., 2003), realizado en lechones obtenidos por cesárea y privados de calostro infectados a los 14 días de edad, se detectó por PCR el PCV2 en hisopos nasales a las 24 horas post infección y en suero a los 7 dpi, estas diferencias podrían asociarse a diferencias en diseño experimental, la virulencia de las cepas, dosis del inóculo, susceptibilidad de los animales o sensibilidad de las técnicas de PCR utilizadas.

De otro lado, en la evaluación de la respuesta de anticuerpos a través de una prueba ELISA comercial, se detectó seroconversión entre los 15 y 21 dpi. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en un ensayo de infección

experimental, realizado en lechones obtenidos por cesárea y privados de calostro infectados a los 20 días de edad, en este estudio se detectó seroconversión entre los 15 y 20 días postinoculación (Okuda et al., 2003). En otro estudio de infección experimental realizado en lechones obtenidos por cesárea y privados de calostro los cuales fueron infectados con una cepa PCV2 a los 20 días de edad se detectaron anticuerpos entre los 15 – 20 días postinoculación (Bolin et al., 2001). Cabe destacar que a pesar de la respuesta inmune humoral detectada en los lechones inoculados, el PCV2 estaba presente en el suero hasta los 30 dpi indicando la capacidad de la cepa de inducir viremia en presencia de anticuerpos circulantes.

3.4 Conclusiones y recomendaciones

- En la infección de lechones privados de calostro con el aislado colombiano PCV2 CO3709 se demostró la patogenicidad de la cepa a través de la seroconversión y la detección del antígeno asociado a lesiones histopatológicas.
- El virus PCV2 CO3709 caracterizado molecular y biológicamente puede ser utilizado como control positivo en pruebas de laboratorio y futuros estudios de patogenicidad del virus.
- El protocolo de infección experimental desarrollado en el presente estudio permitió demostrar que la infección de lechones privados de calostro es una metodología útil para la caracterización biológica de los aislamientos del PCV2.
- Se recomienda realizar futuras investigaciones orientadas al aislamiento y caracterización de más cepas PCV2 de campo con el fin de evaluar la situación epidemiológica de la enfermedad en nuestras condiciones.

Referencias

Alarcon, P., Velasova, M., Mastin, A., Nevel, A., Stärk, K.D., Wieland. B., 2011. Farm level risk factors associated with severity of post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Prev Vet Med.* 101(3-4), 182-91

Albina, E., Cariolet, R., Eveno, E., Hutet, E., Madec, F., 1996. Premiers résultats du CNEVA sur le dépérissement fatal du porcelet en fin de post-sevrage. *Suppl. Sem. Vet.* 834, 1–2.

Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A.C., Adair, B.M., Ellis, W.A., McNulty, M.S., 1995. Pathogenesis of porcine circovirus. Experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.* 44, 49 – 64.

Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998a. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10 (1), 3–10.

Allan, G.M., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., McNeilly, F., Ellis, J., Clark, E.G., Harding, J., Espuna, E., Bøtner, A., Charreyre, C., 1998b. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet. Rec.* 142, 467–468.

Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121, 1–11.

Allan, G.M., Mc Neilly, F., Meehan, B.M., Kennedy, S., Mackie, D.P., Ellis, J.A., Clark, E.G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Botner, A., Charreyre, C.E., 1999.

Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* 66: 115–123

Allan, G.M., McNeilly, F., Meehan, B.M., Ellis, J.A., Connor, T.J., McNair, I., Krakowka, S., Kennedy, S., 2000a. A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health* 47, 81–94.

Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S., 2000b. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch. Virol.* 145, 2421–2429.

Allan, G., McNeilly, F., Meehan, B., McNair, I., Ellis, J., Krakowka, S., Fossum, C., Watrang, E., Wallgren, P., Adair, B., 2003. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 553–560.

Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 2008. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest.* 10(1), 3–10.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc.Acid. Res.* 25, 3389–3402.

Balasz, M., Segales, J., Rosell, C., Domingo, M., Mankertz, A., Urniza, A., Planas-Duran, J., 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 121, 139–148.

Baylis, S.A., Finsterbusch, T., Bannert, N., Blumel, J., Mankertz, A., 2011 Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine*. 4, 690–697.

Bolin, S.R., Stoffregen, W.C., Nayar, G.P., Hamel, A.L., 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 185–194.

Buhk, H.-J., Tischer, I., Koch, M.A., 1985. Cloning and sequencing of the porcine circovirus PCV genome. (Meeting Abstract). *Zbl.Bakt.* 260, 465.

Carman, S., Cai, H., DeLay, J., Youssef, S., McEwen, B., Gagnon, C., Tremblay, D., Hazlett, M., Lusi, P., Fairles, J., Alexander, H., van Dreumel, T., 2008. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease 2004–2006. *Can. J. Vet. Res.* 72, 259–268.

Chianini, F., Majo, N., Segales, J., Dominguez, J., Domingo, M. 2003. Immunohistochemical characterization of PCV2 associated lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol immunopathol* 94, 63-75

Clark, E.G., 1996. Post-weaning multisystemic syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *West. Can. Assoc. Swine Pract.*, 22–25.

Clavijo, J.A., 2007. *Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) en Colombia: Evaluación serológica, caracterización histopatológica de las lesiones y detección del antígeno viral mediante inmunohistoquímica. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p 59*

Daft, B., Nordhausen, R.W., Latimer, K.S., Niagro, F.D., 1996. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a 6 week-old pig. 39th Meeting of the Am. Assoc. Vet. Lab. Diag., Little Rock, AR, p. 32.

Dvorak, C.M., Puvanendiran, S., Murtaugh, M.P., 2013. Cellular pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection. *Virus Res.* 174, 60–68.

Ellis, J.A., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D.M., Bratanich, A., Clark, E.G., Allan, G.M., Konoby, C., Meehan, B.M., Kennedy, S., McNeilly, F., 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11 (1), 3–14.

Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J.* 39, 44–51.

Fernandes, L.T., Mateu, E., Sibila, M., Fort, M., Andaluz, A., McNeilly, F., Allan, G.M., Sánchez, A., Segalés, J., Stevenson, L.S., 2007. Lack of in vitro and in vivo effects of lipopolysaccharide (LPS) on porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol.* 20, 541–552.

Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., Segalés, J., 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26, 1063–1071.

Grasland, B., Loizel, C., Blanchard, P., Oger, A., Nignol, A.C., Bigarre, L., Morvan, H., Cariolet, R., Jestin, A., 2005. Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet. Res.* 36, 685–697.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids.Symp.Ser. 41.

Harding, J., 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).Preliminary epidemiology and clinical presentation. Proc. West. Can. Assoc. Swine Pract., 21.

Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Pathol. 38, 528–539.

Hasslung, F., Wallgren, P., Ladekjaer-Hansen, A.S., Botner, A., Nielsen, J., Watrang, E., Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Timmusk, S., Belak, K., Segall, T., Melin, L., Berg, M., Fossum, C., 2005. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. Vet. Microbiol. 106, 49–60.

Kim, J., Choi, C., Chae, C., 2003. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. J. Comp. Pathol. 128, 52–59.

Kiupel, M., Stevenson, G.W., Mittal, S.K., Clark, E.G., Haines, D.M., 1998.Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. Vet Pathol 35,303–307

Krakovka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy,S., McNeilly, F., Allan, G., 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. Vet Pathol. 37,54-263.

Krakovka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Ring, D.M., Allan, G., 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet. Pathol.* 38, 31–42.

Krakovka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Gilpin, D., Meehan, B., McCullough, K., Allan, G., 2002. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol.* 15, 567–582.

Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., Stadejek, T., Storgaard, T., Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Allan, G., Botner, A., 2002. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet. Microbiol.* 89, 97–114.

Lager, K.M., Gauger, P.C., Vincent, A.L., Opriessnig, T., Kehrli Jr., M.E., Cheung, A.K., 2007. Mortality in pigs given porcine circovirus type 2 subgroup 1 and 2 viruses derived from DNA clones. *Vet. Rec.* 161, 428–429.

LeCann, P., Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., Jestin, A., 1997. Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 141, 660.

Lohse, L., Botner, A., Hansen, A.S.L., Frederiksen, T., Dupont, K., Christensen, C., Bækbo, P., Nielsen, J., 2008. Examination for a viral co-factor in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Microbiol.* 129, 97–107.

Loizel, C., Blanchard, P., Grasland, B., Dory, D., Oger, A., Nignol, A.C., Cariolet, R., Jestin, A., 2005. Effect of granulocytemacrophage colony-stimulating factor on post-weaning multisystemic wasting syndrome in porcine circovirus type-2-transfected piglets. *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 33–43.

Magar, R., Larochelle, R., Thibault, S., Lamontagne, L., 2000. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *J Comp Pathol.* 123(4), 258-69.

Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S., Todd, D., 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78, 221–227.

Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterisation of novel circoviruses associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79, 2171 - 2179.

Misinzo, G., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Inhibition of endosomal-lysosomal system acidification enhances porcine circovirus 2 infection of porcine epithelial cells. *J Virol.* 82 (3), 1128–1135

Okuda, Y., Ono, M., Yazawa, S., Shibata, I., 2003. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 107–114.

Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175–185.

Opriessnig, T., Fenaux, M., Yu, S., Evans, R.B., Cavanaugh, D., Gallup, J.M., Pallares, F.J., Thacker, E.L., Lager, K.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004a. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 98, 209–220.

Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004b. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 41, 624–640.

Opriessnig, T., Halbur, P.G., Yu, S., Thacker, E.L., Fenaux, M., Meng, X.J., 2006a. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet. Rec.* 158, 149–154.

Opriessnig, T., McKeown, N.E., Harmon, K.L., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006c. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 923–929.

Opriessnig, T., McKeown, N.E., Zhou, E.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006d. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *J. Gen. Virol.* 87, 2923–2932.

Ostanello, F., Caprioli, A., Di Francesco, A., Battilani, M., Sala, G., Sarli, G., Mandrioli, L., McNeilly, F., Allan, G.M., Prosperi, S., 2005. Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 108, 179–186.

Pogranichnyy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Sorden, S.D., 2000. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol.* 13, 143–153.

Quintana J., Segalés J., Rosell C., Calsamiglia M., Rodríguez-Arriola G.M., Chianini F., Folch J.M., Maldonado J., Canal M., Plana-Durán J., Domingo M.,

2001. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, Vet. Rec. 149, 357- 361

Quintana, J., Balasch, M., Segalés, J., Calsamiglia, M., Rodríguez-Arrioja, G.M., Plana-Durán, J., Domingo M., 2002. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. Vet Res. 33(3), 229-237.

Reynaud G, Boeuf L, Brunet S, Charreyre C., 2000. Experimental reproduction of PMWS by PCV challenge in piglets aged of 7 weeks. Proc Int Pig Vet Soc, 578.

Rodríguez-Arrioja, G.M., Segalés, J., Balasch, M., Rosell, C., Quintana, J., Folch, J.M., Plana-Durán, J., Mankertz, A., Domingo, M., 2000. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. Vet. Rec. 146, 762–764.

Rosell, C., Segalés, S., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodríguez-Arrioja, G.M., Durán, C.O., Balasch, M., Plana-Durán J., Domingo, M., 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Vet Rec, 146, 40-43

Rovira, A., Balasch, M., Segalés J, García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. J Virol 76, 3232–3239

Saha, D., Lefebvre, D.J., Ducatelle, R., Doorselaere, J.V., Nauwynck, H.J., 2011. Outcome of experimental porcine circovirus type 1 infections in mid-gestational porcine fetuses. Vet Res 7, 64-72

Segalés, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., DelPozo, M., Noval, R., Sacristan, C., DeLasHeras, A., Ferro, A., Latimer, K.S., 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet. Rec.* 141, 60 - 601.

Segalés J., Belak K., Bille-Hansen V., Chae C., Ellis J., Guedes R., Kostka F, Krakowka S., Moldal T., Morvan H., Opriessnig T., Quezada M., Quiroga M. Ramos-Vara J., Ristoski T., Stockhofe-Zurwieden N., Sydler T., Tuboly T., Cortey M. 2010. International immunohistochemistry ring trial for the detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) antigen on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues *Proc. IPVS* p, 316

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionarygenetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599

Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl.Bakteriol.Org. A* 226, 153–167.

Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann,W., Koch, M.A., 1982. Avery small porcine virus with a circular single stranded DNA. *Nature* 295, 64 - 66.

Tomás A, Fernandes LT, Valero O, Segalés J., 2008.A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol.* 132, 260-73.

Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z. and Yang, H., 2009.Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2.*Virus Res.* 145 (1), 151-156

Anexo 1. Procedimiento para el aislamiento del circovirus porcino tipo 2 (PCV2)

Objetivo

Descripción de la técnica de aislamiento del PCV2 en cultivos celulares PK15

Materiales:

- Medio de cultivo para células:

MEM (Gibco Cat.21090-055)

1% L-Glutamine (Gibco Cat. 25030-024)

1% Antibiótico (100 ug/ ml de estreptomicina y 100 U/ ml de penicilina)

10% Suero Fetal Bovino (Ref. F7524 Sigma-Aldrich)

- Solución salina tamponada (PBS)
- Solución Tripsina-EDTA (Ref. T3924 Sigma-Aldrich).
- Frascos para cultivo celular T25, T75 y T125 Tubos estériles para centrifuga de 15 y 50 ml
- Microplaca de 24 orificios
- Pipetas x 5, 10 y 20 ml
- Puntas estériles de 100 y 1.000 μ l
- Viales estériles x 1.5 ml
- Corofomo 99% (SIGMA Cat. C2432)

Protocolo:

1. Preparar una suspensión de tejido 10% peso/volumen en medio mínimo esencial (MEM) con 100 ug/ml de estreptomicina, y 100 ug/ml de penicilina.
2. Congelar a -70°C y descongelar las muestras de tejidos tres veces y centrifugar a 2.500 rpm durante 30 minutos a 4°C.
3. Añadir 50 µl de cloroformo por cada ml del líquido sobrenadante y mezclar continuamente a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C y remover el sobrenadante evitando tomar el cloroformo.
5. Filtrar los sobrenadantes con filtros de 0.22 micras y depositar en viales estériles. Mantener a -70°C hasta su utilización.
5. A partir de un cultivo de células PK15 con 24 horas de incubación, preparar una suspensión de 8×10^4 células/ml en medio de cultivo MEM para crecimiento con 10% de suero fetal bovino (SFB).
7. Mezclar la suspensión celular con los sobrenadantes filtrados en una relación de 10:1. Preparar dos T25 y llevar a incubación a 37 ° C con CO₂ al 5% durante 18 horas.
8. Transcurrido este tiempo, elimine el medio de cultivo y lave las células una vez con solución salina tamponada (PBS).
9. Adicione a cada frasco 2 ml de D-Glucosamina (300mM) en solución salina basal de Hanks durante 15 minutos a 37°C.
10. Elimine completamente la D- Glucosamina y adicione medio MEM para crecimiento con 5% de SFB.
11. Deje en incubación a 37 ° C con CO₂ al 5% durante 48 horas.
12. A los tres días, congele (a -70°C) y descongele tres veces uno de los frascos con cultivos inoculados.
13. Clarificar la suspensión por centrifugación a 2.500 rpm por 10 minutos y colectar en viales estériles el sobrenadante.
14. Para el siguiente pase, prepare una suspensión de 8×10^4 células/ml en medio de cultivo MEM para crecimiento con 10% de suero fetal bovino (SFB)

- con el otro frasco que contiene el cultivo de células PK15 infectado.
16. Mezcle la suspensión celular con el sobrenadante celular previamente preparado en una relación de 5:1 y lleve a incubación a 37°C con CO₂ al 5% por 18 horas. Repita el tratamiento con D-Glucosamina (300mM) y lleve a incubación por 48 horas más.
 17. En el tercer pase, repita el procedimiento anterior y prepare adicionalmente una microplaca de 24 orificios con células PK15 infectadas y otra con células PK15 no infectadas como control negativo.
 18. Transcurrido el tiempo de incubación, fije la microplaca según el protocolo de la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IMPA).
 19. Para la preparación del stock del virus: congele (-70°C) y descongele tres veces los frascos con células infectadas. Centrifugue la suspensión a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Deposite en viales estériles alícuotas de 1ml y conserve a -70°C.

Referencia

Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998a. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10 (1), 3–10.

Anexo 2. Técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) para la detección del circovirus porcino tipo 2

Objetivo

Descripción de la técnica de Inmunoperoxidasa en Monocapa (IPMA) para la detección del PCV2 en cultivos celulares

Materiales

PBS: Para 1 litro: NaCl	8,0 gr
KCl	0,2 gr
Na ₂ HPO ₄	1,15 gr
KH ₂ PO ₄	0,2 gr

Proteína A (SIGMA P8651- 1 mg)

Solución de Revelado (AEC DAKO Cytomation K3469 x 110 ml)

Acetona (J.T. Baker Cat. 9006-03, México)

Peroxido de hidrógeno 30% (Carlo Erba Cat. 7722-84-1, Francia)

Albúmina Sérica Bovina (ASBSigma A 7030-50G, USA)

Metanol absoluto (J.T. Baker Cat. 9070-02, México)

Tween 20 (Sigma-Aldrich Cat. P1379, USA)

Agua destilada

Suero de campo hiperinmune porcino para PCV2 (título seroneutralizante \geq 1:4,096)

Multicanal

Micropipeta

Puntas no estériles de 200 μ l y 1000 μ l

Pipetas de 20 ml

Canoas

Tubos falcon de 50 ml

Incubadora a 37°C

Congelador -20°C

Microscopio óptico

Procedimiento

1. Las células a teñir bajo este procedimiento se deben lavar una vez con 200 μ l de PBS
2. Fijar las células con una solución de metanol- acetona en proporción 50:50 fría. Dispensar 50 μ l en cada pozo de una microplaca de 96 orificios y llevar al congelador -20°C durante un mínimo de 20 minutos.
3. Eliminar el fijador y dejar evaporar. Si no se colorea la microplaca el mismo día, forrarla en papel aluminio y conservar a 4°C.
4. Para inhibir la peroxidasa endógena, dispensar 50 μ l de metanol con peróxido de hidrógeno al 1%.
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar tres veces la microplaca con 200 μ l /pozo de PBS + Tween 1% + ASB 1%
7. Preparar el anticuerpo primario en dilución 1: 200 en PBS-Tween 1%-ASB 1%.Dispensar 50 μ l por pozo.
8. Incubar 1 hora a 37°C en cámara húmeda
9. Lavar tres veces la microplaca con 200 μ l /pozo de PBS + Tween 1% + ASB 1%
10. Preparar la Proteína A en una concentración final de 0,67 μ g/ml en PBS + Tween 1% + ASB 1% (Dilución 1/750) y dispensar 50 μ l /pozo
11. Incubar 1 hora a 37°C en cámara húmeda
12. Lavar 3 veces la microplaca con 200 μ l /pozo de PBS+Tween 1%+ ASB 1%
13. Adicionar en cada pozo una gota (50 μ l) del revelador AEC
14. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
15. Lavar tres veces con agua destilada
16. Eliminar el agua por inversión y leer en microscopio óptico (Objetivo 40X)

Referencia

Rodriguez-Arriola, G.M., Segalés, J., Balasch, M., Rosell, C., Quintana, J., Folch, J.M., Plana-Durán, J., Mankertz, A., Domingo, M., 2000. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. Vet. Rec. 146, 762–764.

Anexo 3. Técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del circovirus porcino tipo 1 (PCV1)

Objetivo

Descripción de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del PCV1 en muestras de fluidos y tejidos

1. Cebadores:

Nombre	Secuencia 5'- 3'	Número de acceso	Posición en el genoma	Longitud del amplificado (pb)
p8	TTACCGGCGCACTTCGGCAG	AF027217 (Hamel et al., 1998)	1776-18	194
p4	TTCCAAACCTTCCTCTCCGC		203- 184	

2- Mezcla de la reacción:

Reactivo	Distribuidor	Concentración final	Cantidad/ muestra (μl)
Agua			12,5
Buffer PCR	Promega	1 X	5
MgCl ₂	Promega	3 mM	3
dNTPs	Invitrogen	0.2 mM/dNTP	0,5
p8	IDT Technologies	0,5 μM	0,625
p4	IDT Technologies	0,5 μM	0,625
Taq Polimerasa	Promega	0,05 U/μl	0,25
Total mezcla			22,5 μl
ADN			2,5 μl

3. Condiciones de la PCR

No. de ciclos	° C	Tiempo
1	94	5 minutos
35	94	30 seg
	58	1 minuto
	72	30 seg
1	72	7 minutos
1	4	∞

La amplificación es realizada en un termociclador Bio Rad ALS-1296 (Bio-rad Laboratories, Inc. USA).

4- Visualización

Los fragmentos amplificados son visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA A-9539) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen 15581-044) teñidos con EZ Vision™ Three (Amresco N-313).

Referencia:

Quintana J, Segalés J, Rosell C, Calsamiglia M, Rodríguez-Arriola GM, Chianini F, Folch JM, Maldonado J, Canal M, Plana-Durán J, Domingo M., 2001. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Veterinary. Record. 149, 357-361

Anexo 4. Técnica Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del PCV2

Objetivo

Descripción de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del PCV2 en muestras de fluidos y tejidos

1. Cebadores:

Nombre	Secuencias 5'- 3'	Número acceso	Posición genoma	Longitud del amplicon (bp)
PCV7	GCCAGTTCGTCACCCTTTC	AF027217 (Hamel et al., 1998)	940- 958	657
PCV17	CTCCCGCACCTTCGGATAT		1578-1596	

2. Mezcla de la reacción:

Reactivo	Distribuidor	Concentración final	Cantidad/ muestra (μl)
Agua			12,5
Buffer PCR	Promega	1x	5
MgCl ₂	Promega	3mM	3
dNTPs	Invitrogen	0.2 mM/dNTP	0,5
PCV7	IDT Technologies	0.5 μM	0,625
PCV17	IDT Technologies	0.5 μM	0,625
Taq Polimerasa	Promega	0,05 U/μl	0,25
Total mezcla			22.5 μl
ADN			2.5 μl

3. Condiciones de la PCR

No. De ciclos	° C	Tiempo
1	94	30 seg
35	94	30 seg
	64	1 minuto
	72	30 seg
1	72	7 minutos
1	4	∞

La amplificación es realizada en un termociclador Bio Rad ALS-1296 (Bio-rad Laboratories, Inc. USA).

4. Visualización

Los fragmentos amplificados son visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA A-9539) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen 15581-044) teñidos con EZ Vision™ Three (Amresco N-313).

Referencia:

Quintana J, Balasch M, Segalés J, Calsamiglia M, Rodríguez-Arrioja GM, Plana-Duran J, Domingo M. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type (PCV2) in rabbits and mice., 2002. Veterinary Research33, 229-237.

Anexo 5. Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del ORF2 del circovirus porcino tipo 2 (PCV2)

Objetivo

Descripción de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del ORF2 del PCV2

1. Cebadores

Nombre	Secuencias 5'- 3'	Número acceso	Posición genoma	Longitud del amplicon (bp)
CapFw	CCGTTGGAATGGTACTCCTC	AY579893 (Yu & Zhang.,2004)	825 - 844	935
Cap Rw	ACAGCGCACTTCTTTCGTTT		1760 – 1741	

2. Mezcla de la reacción:

Reactivo	Distribuidor	Concentración final	Cantidad/ muestra (μl)
Agua			12,25
Buffer PCR	Promega	1x	5
MgCl ₂	Promega	1.5mM	1,5
dNTPs	Invitrogen	0.2 mM/dNTP	0,5
CapFw	IDT Technologies	0.6 μM	0,75
Cap Rw	IDT Technologies	0.6 μM	0,75
Taq Polimerasa	Promega	0,05 U/μl	0,25
Total mezcla			21
ADN			4

2. Condiciones de la PCR

No. De ciclos	° C	Tiempo
1	94	5 minutos
35	94	45 seg
	57	45 seg
	72	45 seg
1	72	12 minutos
1	4	∞

La amplificación es realizada en un termociclador Bio Rad ALS-1296 (Bio-rad Laboratories, Inc. USA).

4. Visualización

Los fragmentos amplificados son visualizados por electroforesis estándar empleando 10 µl de la reacción final en un gel de agarosa (SIGMA A-9539) de 1,5% en Buffer TBE 10x (Invitrogen 15581-044) teñidos con EZ Vision™ Three (Amresco N-313).

Anexo 6. Técnica de inmunohistoquímica para la detección del antígeno viral del PCV2 en tejidos

Objetivo

Descripción de un método de laboratorio para la detección del PCV2 en tejidos fijados en formalina

Materiales

Hydrogen Peroxide 3.00 % (ISU Chem. Stores, Cat No. 12.3950K)
Protease 0.10 % (Sigma, Cat No. P-5147)
DAKO® Tris Buffered Saline pH 7.6; TBS (DAKO, Cat No. S1968)
DAKO® Labeled Streptavidin-Biotin 2 System kit; LSAB 2 (DAKO, Cat No. K675)
DAKO® Antibody Diluent (DAKO, Cat No. S3022)
DAKO® Liquid DAB (Diaminobenzidine) Substrate-Chromogen System; DAB (DAKO, CatNo. K3466)
Poly-L-lysine coated slides (Newcomer Supply, Cat No. 5043)
Hematoxylin Stain, Gill 3 – Triple Strength (Anapath, Cat No. SL-95-1)
Histo-mount (Shandon, Cat No. 9999122)
AntiPCV2-policlonal desarrollado en conejo adquirido en Iowa State University, USA

Procedimiento

1. Desparafine e hidrate las secciones histológicas (consulte SOP: PROC-G-3007)
2. Trate las secciones histológicas con peróxido de hidrógeno 3,00% durante 10 minutos
3. Enjuague tres veces con agua desionizada
4. Trate las secciones con proteasa 0.05% durante 2 minutos
5. Enjuague dos veces con agua desionizada
6. Enjuague una vez con TBS DAKO
7. Aplique 200 μ l (3-4 gotas) del AntiPCV2-policlonal (Dilución 1:200)

8. Incube a temperatura ambiente por 1 hora
9. Enjuague una vez con TBS DAKO
10. Aplique 200 μ l (3-4 gotas) del anticuerpo secundario (DAKO LSAB 2) e incube por 10 minutos a temperatura ambiente
11. Enjuague una vez con TBS DAKO
12. Adicione 200 μ l (3-4 gotas) del anticuerpo terciario (DAKO LSAB 2, Label) e incube por 10 minutos a temperatura ambiente
13. Enjuague una vez con TBS DAKO
14. Adicione 200 μ l del sustrato- cromógeno DAKO DAB (3 a 4 gotas) (1 gota del cromógeno a 1 ml del sustrato) e incube durante 5 minutos.
15. Lave una vez con agua des-ionizada
16. Realice la coloración de contraste con hematoxilina de Gill durante 10 a 30 segundos.
17. Enjuague con agua destilada y proceda a la deshidratación con etanol 95,0% y etanol absoluto. Proceda al montaje con cubreobjetos utilizando la solución de montaje.

Control positivo

Una lamina histopatológica control positivo debe incluirse en cada montaje de la prueba

Referencias

PRRS-IHC, Slide-Prep etc. *Refer to SOP*: PROC-I-1013, Minnesota University, USA.

4. Dinamica de la infección y respuesta de anticuerpos en cerdas de reemplazo subclínicamente infectadas por el circovirus porcino tipo 2 y efecto en su progenie

Abstract

The primary objective of this study was to assess dynamics of PCV2 infection and serum antibody titers in gilts from breeding farms subclinically affected by PMWS and the litter PCV2 infection. Four breeding herds were included in the study and 40 gilts were selected at randomly. Blood samples, nasal and vaginal swabs were collected from the gilts at arrival, acclimatization, farrowing and one day after the farrowing. Colostrum samples were collected immediately after parturition. Blood, nasal swab or tissue samples was collected from four piglets prior to suckling. All samples were analyzed for the presence of virus neutralization antibodies and amount of PCV2 DNA by in-house SYBR green real-time PCR assay. A high level of viremia and a high viral load of PCV2 in nasal and vaginal swabs were detected in healthy gilts at the arriving showing the introduction of infected animals into the farms. In addition, most of the gilts were positive for PCV2 DNA in serum, nasal and vaginal swabs at farrowing. Dam infection resulted in detectable viremia, development of anti-PCV2 antibodies, and the presence of PCV2 DNA in tissue samples of live-born normal appearing piglets confirming the potential of vertical transmission of PCV2 infection. PCV2a and PCV2b genotypes were related to *in utero* PCV2 infection. This finding suggests that PCV2 vaccination program in gilts should be emphasized to protect their piglets from PCV2 infection.

Keywords: Porcine circovirus type 2 (PCV2), gilts, newborn piglets, SYBR green real-time PCR

Introducción

La circovirus porcina es una enfermedad de amplia distribución a nivel mundial asociada con diferentes manifestaciones clínicas o infección subclínica que afecta los porcinos en las diferentes etapas de producción. La presentación clínica de la infección sistémica asociada al circovirus porcino tipo 2 (PCV2) se caracteriza por retraso en el crecimiento (frecuentemente acompañado de palidez, disnea y en menor medida diarrea y/o ictericia) en cerdos de crecimiento con linfadenopatía generalizada (Chae et al., 2005).

Las fallas reproductivas asociadas al PCV2 son menos comunes, sin embargo, las cerdas infectadas pueden presentar aborto siendo más común el aumento en el número de momias, mortinatos y el nacimiento de lechones débiles (O'Connor et al., 2001; West et al., 1999). La infección uterina por el PCV2 puede ocasionar también mortalidad embrionaria (Mateusen et al., 2007).

El primer reporte de falla reproductiva al PCV2 ocurrió en Canadá en una granja recientemente instalada y poblada con 450 cerdas de primer parto. Durante los primeros cuatro meses de operación, la granja tenía un porcentaje de partos de aproximadamente un 58%, se presentaban abortos tardíos (después de 13 semanas de gestación), aumento en la tasa de mortinatos y momias con ausencia de signos clínicos en las reproductoras. En el estudio de este caso no se estableció la presencia de otros agentes comúnmente asociados con lesiones fetales y aborto en porcinos como: parvovirus porcino, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), virus de la encefalomiocarditis y enterovirus (West et al., 1999).

En la literatura internacional también se encuentran descritos varios casos de falla reproductiva asociada al PCV2 en granjas seropositivas (Janke, 2000; Nielsen et al, 2004), en granjas nuevas, en poblaciones porcinas recientemente infectadas (Brunborg et al., 2007; Pittman, 2008), en co-infección con otros

patógenos comúnmente implicados en problemas reproductivos (Pescador et al, 2007, Castro et al, 2012). Así como, en una explotación japonesa históricamente seronegativa al PCV2 (Togashi et al, 2011). Las características clínicas comunes en estos casos incluyeron incremento en el número de fetos momificados y nacidos muertos al parto, ausencia o bajo número de cerdas con signos clínicos y la resolución del episodio reproductivo entre 2 y 5 meses después de la detección inicial.

Teniendo en cuenta que la información disponible acerca de la infección de las cerdas de reemplazo por el PCV2 es limitada, el objetivo del presente estudio fue evaluar la dinámica de la carga viral y la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente al PCV2 en cerdas de reemplazo y el efecto de la infección *in utero* por el PCV2 en la inducción de anticuerpos neutralizantes y la carga viral en su progenie.

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Selección de las granjas

En este estudio participaron cuatro granjas de cría cuya selección fue determinada por participación voluntaria de los productores y la capacitación técnica del personal responsable de la atención del parto y de la colección de las muestras. Dos granjas (A y B) se localizan en el departamento de Antioquia, una en Cundinamarca (C) y la granja D, en Risaralda.

En ninguna de las granjas se vacunaron las cerdas de reemplazo frente al PCV2 durante el periodo de realización del estudio, pero en la granja D se recibían cerdas provenientes de una granja multiplicadora donde se vacunaban al destete los lechones. En todas las granjas participantes existían reportes de laboratorio que confirmaban la presencia de animales seropositivos pero durante el tiempo de iniciación del estudio no se reportaron signos clínicos del síndrome multisistémico de emaciación postdestete (PMWS) o de otras enfermedades

asociadas al PCV2 (PCVAD) en el hato de cría. Las cerdas de reemplazo seleccionadas se siguieron desde el momento de ingreso a las granjas hasta su primer parto. El estudio se realizó entre marzo y diciembre de 2010. Las características de cada explotación se resumen en la Tabla 1.

4.1.2 Colección de las muestras

En las granjas seleccionadas los profesionales responsables recibieron por escrito las instrucciones referentes a la selección de las cerdas de reemplazo y lechones neonatos, la toma y el envío de muestras al laboratorio.

Tabla 1. Características de las granjas seleccionadas para el estudio.

	Granja A	Granja B	Granja C	Granja D
Departamento	Cundinamarca	Antioquia	Antioquia	Risaralda
Municipio	Mosquera	Fredonia	Jericó	Santa Rosa
No. Cerdas	100	1035	1263	600
Tipo de explotación	Comercial ciclo completo	Multiplicadora	Multiplicadora	Comercial ciclo completo
Tasa de reemplazo (%)	40	50	48	40
Línea genética de las hembras	G&P	YxL	LxLW	Topigs 40
Edad ingreso reemplazos (días)	135	155	150	30
Tiempo cuarentena (días)	60	30	30	180
Edad al primer servicio (días)	210	210	210	240
Estatus frente al virus del PRRS	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Estatus frente al virus de Aujeszky	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

En el momento de ingresar un lote de cerdas de reemplazo en cada explotación se seleccionaron al azar 10 cerdas clínicamente sanas, las cuales fueron introducidas a los corrales de cuarentena de la explotación según la rutina normal de manejo. En la granja D, las cerdas ingresaron con un promedio de edad de 30 días mientras que en las granjas A, B y C llegaron con 135 a 155 días de edad. En el momento del ingreso se colectaron muestras de sangre, hisopos nasales e hisopos vaginales de estos animales. Este mismo muestreo se realizó al final del periodo de aclimatización, al parto y 24 horas post-parto.

El parto de las cerdas fue supervisado individualmente y de cada una se tomó una muestra de calostro al iniciar el parto y a las 24 horas post-parto. Desde su ingreso todas las cerdas fueron monitoreadas semanalmente para registrar la presencia de signos clínicos asociados al PCV2 y en todas se permitió el parto en forma natural.

Luego, de cada camada se seleccionaron al azar cuatro lechones nacidos vivos aparentemente sanos, independientemente del sexo o peso los cuales fueron identificados individualmente. Inmediatamente después del nacimiento se colocaron en una caja seca para evitar el consumo de calostro antes de la colección de sangre e hisopos nasales. Dos de los cuatro lechones fueron seleccionados para la eutanasia el mismo día del nacimiento y se colectó muestras de ganglios linfáticos (pool), tonsila, bazo, pulmón, corazón, riñón e hígado. Todas las muestras fueron enviadas al laboratorio en condiciones de refrigeración y después de su arribo el suero, los hisopos, el calostro y los tejidos de los lechones se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

4.1.3 Serología

Las muestras de suero de las cerdas y lechones neonatos fueron evaluadas para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes (AN) frente al PCV2, de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Fort et al., 2007. Brevemente, el procedimiento utilizado fue el siguiente: 50 microlitros (µl) de la muestra de suero fueron diluidas en forma seriada de 1:2 a 1:4096 en una microplaca de 96 pozos en medio Dulbecco's Modified Eagle suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L glutamina, 10.000 U/ml de penicilina y 50 mg/ml de streptomycin. Las muestras fueron incubadas por 1 hora a 37°C con 200TCID₅₀/pozo de la cepa viral colombiana PCV2 CO3709 (genotipo PCV2b). Posteriormente, en cada pozo se adicionó una suspensión de 1.2x10³ células PK15 y se incubaron 72h a 37°C con 5% de CO₂ (Anexo 1).

Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas dos veces con solución salina tamponada (PBS) y se fijaron con una solución de metanol-acetona 50% a - 20°C durante 30 minutos para la detección del antígeno viral a través de la técnica de Inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) descrita en el Anexo 2. Brevemente el procedimiento de la prueba es el siguiente: las microplacas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con un suero hiperminimune al PCV2 en dilución 1:200 en PBS. Luego del lavado con PBS-Tween (0.1% Tween 20 y 1% de albumina sérica bovina), se adicionó Proteína A marcada con peroxidasa (SIGMA P8651- 1 mg) en una concentración de 0.6 $\mu\text{mg ml}^{-1}$ y se llevaron a incubación por 1 hora a 37°C. Posteriormente, las microplacas fueron lavadas con PBS-Tween y tratadas con amino-ethylcarbazole (AEC DAKO Cytomation K3469) para el revelado de la reacción. Todas las muestras fueron examinadas por duplicado y en cada placa se incluyó una muestra control positivo con un título $\geq 1:4096$ y como control negativo se utilizó medio DMEM (una fila de la microplaca).

Finalmente, para la validación de la prueba se evaluó la concentración viral y mediante microscopia óptica se determinó en cual concentración de suero se detectaba células positivas al PCV2. El título seroneutralizante 50 (VND50) se calculó como la máxima dilución de suero capaz de bloquear la replicación del PCV2 en el 50% de los pozos del cultivo celular PK-15 (Karber, 2001). En el ensayo la mínima dilución contenía 25% de suero (1:1 dilución de suero + un volumen igual de virus PCV2), por tanto, el calculo de conversión de la prueba fue 2 Log_2 (Meerts et al., 2006).

4.1.4 Detección y cuantificación de la carga viral y diferenciación de los genotipos PCV2a/PCV2b

4.1.4.1 Extracción del ADN

Para la obtención del Acido Desoxirribonucleico (ADN) se utilizó el kit de extracción comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA)

utilizando 200 µl de suero y 20 mg de homogenizado de un pool de tejidos siguiendo el protocolo descrito por el laboratorio productor. En el caso del calostro, 5 ml de la muestra se llevaron a centrifugación a 900g por 10 minutos, se removió la capa de grasa y se colectó 1 ml de la fase acuosa.

La extracción del ADN se realizó a partir de 200 µl del líquido empleando el mismo kit de extracción. Por su parte los hisopos nasales y vaginales fueron resuspendidos en 1000 µl de PBS estéril y agitados con ayuda de un vortex durante 15 segundos. El ADN fue obtenido a partir de 400 µl de la suspensión empleando el kit mencionado anteriormente. Para evaluar la presencia de contaminantes durante el proceso de extracción, en cada grupo de muestras procesadas se incluyó como control negativo, 200 µl de agua destilada libre de ADNasa/ARNasa (Invitrogen 10977-023). El ADN obtenido fue diluido en 50 µl de agua grado molecular (ADNase/ARNase libre) y conservados a -70°C hasta su procesamiento.

4.1.4.2 Diseño de los cebadores para la prueba cuantitativa SYBR Green

El cebador directo (ABF 5'- CCAGAATTCAACCTTMACYTTYC-3') y el cebador reverso (ABR 5'- GCGGTGGACATGMTGAGATT-3') fueron diseñados para amplificar un segmento del ORF2 con base en el genoma completo de la cepa ZhuJi2003 (AY579893) publicada en el Gen Bank. Para la construcción de la curva estándar se empleó un plásmido gentilmente donado por el Dr. Carl Gagnon de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Montreal en St. Hyacinthe, Quebec, Canadá.

La concentración de ADN en las diluciones seriadas del plásmido (1×10^{-1} a 1×10^{-12}) utilizadas en la construcción de la curva estándar fue determinada en un equipo Thermo Scientific NanoDrop™ ND-2000, con densidad óptica de 260 nm

cuyo resultado es luego convertido en copias de ADN por mol de la muestra (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>). La reacción de amplificación se corrió en el termociclador LightCycler 480 SYBR® Green I Master (Roche Diagnostics) utilizando 1 µl de cada cebador (1 µM), 10 µl de la solución SYBR Green I Master x 2 conc. (Roche Cat. 04 887 352 001), 3 µl de agua grado molecular y 5 µl del template de ADN para un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la prueba PCR en tiempo real fueron las siguientes: 95°C por 1 minuto seguido de 40 ciclos de amplificación a 95°C por 1 minuto, 61°C por 25 segundos y 72°C por 5 segundos. El análisis de la curva de disociación (T_m) fue realizado a 95°C por 1 minuto, 68°C por 1 minuto y 90°C por 0 segundos y enfriamiento a 0°C por 30 segundos (Anexo 3). Todas las reacciones (estándar, muestras de campo y controles) fueron analizadas por duplicado en pozos adyacentes de la misma placa y de los resultados se obtuvo el promedio. Para los análisis de la T_m , se empleó el software del mismo equipo LightCycler (Roche Diagnostics).

4.1.4.3 Análisis estadístico

La concentración viral promedio fue expresada como \log_{10} del número de copias de ADN del PCV2 (ADN PCV2) por ml o por mg de tejidos evaluados. Los datos fueron evaluados usando el análisis de varianza con el Programa estadístico SAS 2000. Para la comparación de los promedios se empleó la prueba de rango múltiple de Duncan, el nivel de significancia fue indicado con una probabilidad de $P < 0.05$

4.2 Resultados

4.2.1 Especificidad de los cebadores

La especificidad de los cebadores fue confirmada por comparación de 23 secuencias colombianas secuenciadas y secuencias publicadas en el GenBank utilizando el programa BLASTn (Altschul et al., 1997). Los cebadores fueron diseñados para unirse a la hembra monocatenaria de ADN en la temperatura

predictiva y para mostrar poco potencial de dimerización y autoreacción. Basados en estos criterios, los oligonucleótidos ABF5' y ABR5' fueron seleccionados para el desarrollo del protocolo de la prueba PCV2 tiempo real - SYBR Green. Estos cebadores amplificaron una región del gen de la cápside (ORF2) ubicada entre los nucleótidos 1417 -1534.

4.2.2 Optimización y especificidad de la PCR tiempo real

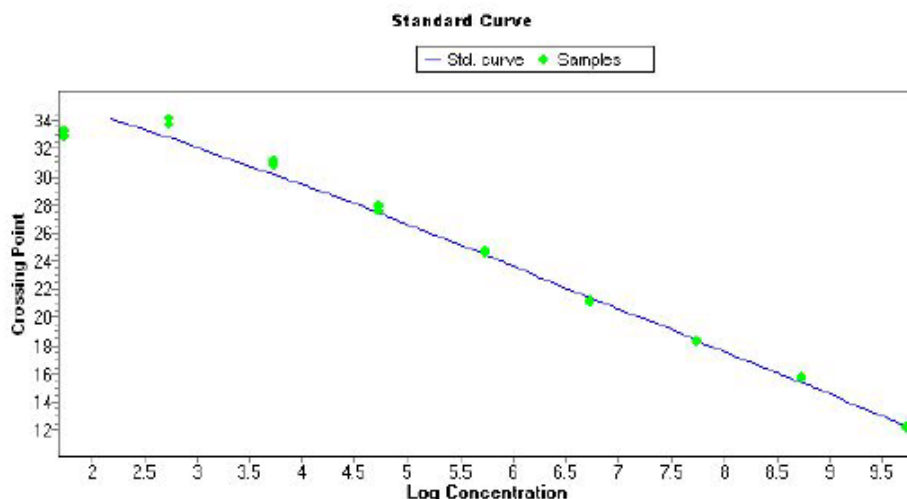
Las amplificaciones a través de un gradiente de temperatura indicaron que la temperatura óptima para el anillamiento de los cebadores ABF5' y ARF5' fue 61°C. La especificidad de los cebadores fue evaluada empleando ácido nucleico del circovirus porcino tipo 1 (PCV1) obtenido del sobrenadante de la línea celular PK15 ATCC CCL-33, las cuales están persistentemente infectadas con este virus. Como controles positivos se emplearon las cepas colombianas PCV2a (CO3009) y PCV2b (CO3739). La amplificación de un producto de 118 pb fue confirmada por electroforesis únicamente con los virus PCV2.

4.2.3 Optimización de la prueba PCR tiempo real SYBR GREEN

La curva estándar de la prueba fue definida para un rango de concentración de ADN entre 5.45×10^{-11} a 5.45×10^{-3} del plásmido por 20 µl de reacción (Figura 1). La porción lineal de la curva estándar, abarcó un rango entre $5,45 \times 10^{-9}$ a $5,45 \times 10^{-1}$ por lo tanto, el límite inferior de detección (o de corte) fue $5,4 \times 10^{-1}$ copias por 20 µl de reacción, equivalente a $5,4 \times 10^{-4}$ copias por ml.

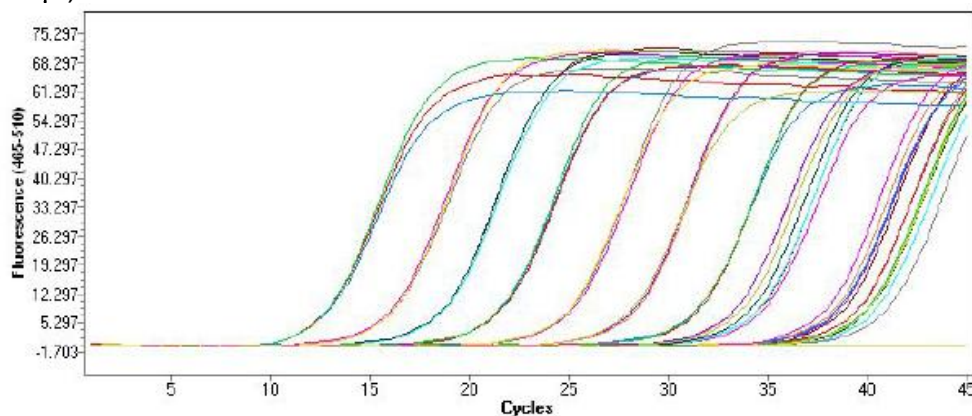
Este punto de corte correspondió al umbral (Ct) de 34.11, por tanto, las muestras con valores Ct inferiores a este valor fueron reportadas como negativas o por debajo del límite de detección de la prueba. El factor de dilución de la muestra fue considerado para el cálculo de la copias del PCV2 en los especímenes originales y las concentraciones de virus fueron expresadas como el promedio de copias virales log10 por ml o mg de la muestra.

Figura 1. Curva estándar (número de copia vs ciclo umbral (Ct) para diluciones del plásmido y muestras de campo en la prueba SYBR Green correspondientes a tres pozos con 20 µl de reacción total.



En la figura 2, se presenta las señales fluorescentes de la prueba durante la PCR tiempo real y la curva estándar obtenida. Como se esperaba se obtuvo una buena relación lineal entre el Ct calculado y la concentración logarítmica de ADN, dado que la concentración del ADN viral aumentó exponencialmente durante la reacción de amplificación.

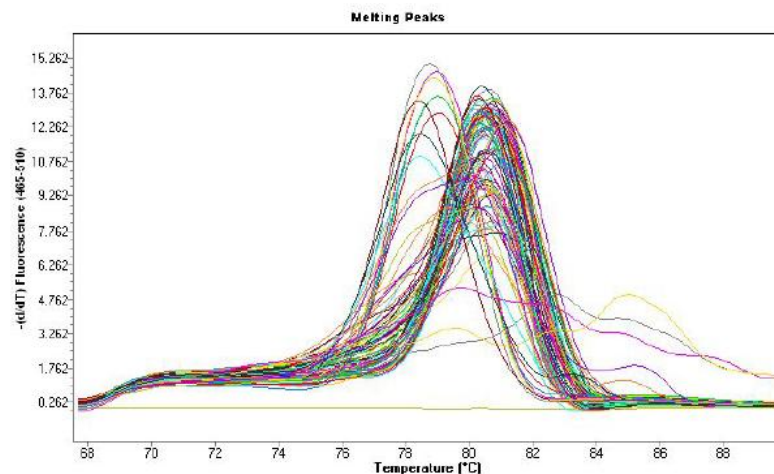
Figura 2. Señales fluorescentes durante la reacción SYBR Green para cada serie de dilución del plásmido de ADN (118pb fragmento; 5.45×10^{-11} a 5.45×10^{-3} copias /µl).



El análisis de las curvas de disociación (Figura 3) empleando diluciones del plásmido (5.45×10^{-9} to 5.45×10^{-1} copias), controles y 10 muestras de campo

permitió establecer la clasificación genotípica de las muestras positivas. La T_m para los productos de la PCR clasificados como PCV2a o PCV2b fue $78,74 \pm 0,06^\circ\text{C}$ y $80,66 \pm 0,11^\circ\text{C}$ respectivamente. Una diferencia de $1,92^\circ\text{C}$ entre los productos amplificados por la prueba SYBR Green desarrollada fue evidente, permitiendo la discriminación entre estos dos genotipos. Las muestra de ADN control negativo (agua grado molecular) no evidenciaron ningún producto de amplificación y ni se evidenció pico de T_m .

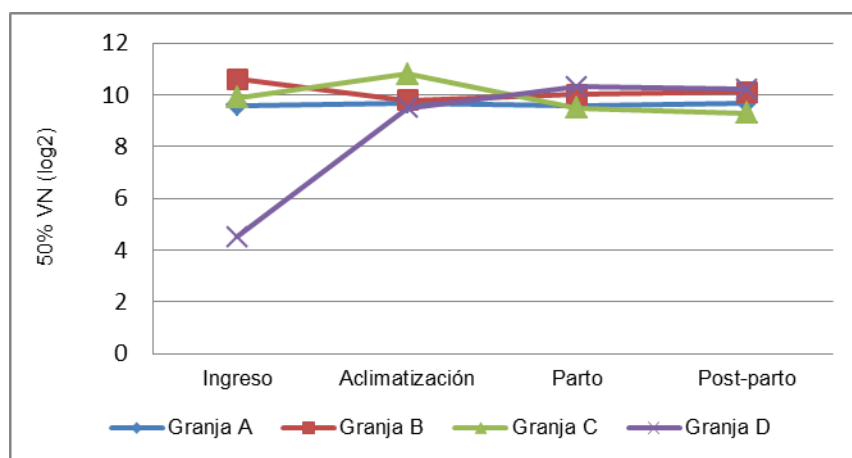
Figure 3. Comparación de las curvas de fusión de los productos PCR SYBRGreen para los genotipos PCV2a/PCV2b mostrando una diferencia de $1,99^\circ\text{C}$ entre ambos genotipos.



4.2.4 Anticuerpos neutralizantes en las cerdas

El 100% de las cerdas presentaron títulos de AN al ingreso, aclimatización, parto y un día post-parto. Respecto a la distribución de los títulos de anticuerpos, se encontró variaciones entre granjas independientemente del tiempo del muestreo, evidenciándose animales con títulos bajos (1:16) y otras con títulos serológicos mayores o iguales a 1:4,096. Con excepción de la granja D, los títulos de AN fueron similares al ingreso, aclimatización, al parto y post-parto (Figura 4).

Figura 4. Comparación de los promedios en los títulos de anticuerpos neutralizantes (VNT50) en las cerdas expresados en Log2.



4.2.5 Anticuerpos neutralizantes en los lechones neonatos

En los sueros precalostrales de los lechones neonatos se detectó AN en las cuatro granjas con porcentajes de animales positivos que variaron del 17,5% al 27,5 % y del total de lechones examinados, el 23,1% presentaba títulos de AN (Tabla 2). La distribución de los títulos estuvo en el rango de 1:4 a 1:32 sin embargo no se encontró diferencias significativas en el título de AN (VNT50) entre las explotaciones.

Tabla 2. Promedio de los títulos de anticuerpos neutralizantes (VNT50) expresados en Log2 de las muestras de suero precalostral de los lechones neonatos evaluados

Granja	Cerdas No.	Lechones positivos/Total	% positivos	Promedio del título de AN (VNT50) Log ₂
A	10	11/40	27,5	4.2 ^a
B	10	10/40	25	4.3 ^a
C	10	9/40	22,5	4.1 ^a
D	10	7/40	17,5	4.0 ^a
	40	37/160		

Los promedios de los títulos de anticuerpos de los lechones con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.6 Carga viral en las cerdas

En la tabla 3, se presenta el número de muestras positivas (suero, calostro e hisopos nasales y vaginales) por la técnica SYBR Green y el promedio de la carga viral para el PCV2 en las muestras positivas de las cerdas examinadas en cada una de las granjas. El análisis de las muestras en los diferentes estados productivos mostró diferencias en el número de cerdas PCV2 ADN positivas y en todas las explotaciones se demostró el ingreso de cerdas viremias aun cuando en ninguno de los animales se observó signos clínicos asociados a la infección por el PCV2.

En las granjas A, B y D no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con relación a la carga viral en el suero en las cuatro fases analizadas. En contraste, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la granja C, al comparar las cargas virales entre la fase de aclimatización y el parto ($p < 0.05$).

Con relación a la carga viral detectada en las muestras de hisopados nasales, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre granjas. Pero en el caso de los hisopos vaginales se encontró diferencias estadísticamente significativas en la granja A, entre el ingreso y parto, ingreso y post-parto ($p < 0.05$).

En el caso de las muestras de calostro, se detectó un bajo número de muestras positivas en las granjas B y C pero los resultados de las cerdas con excreción viral a través de calostro fueron consistentes entre el parto y post-parto. Por otro lado, la carga viral en calostro fue menor a la encontrada en suero.

Tabla 3. Carga viral obtenida por la prueba PCR SYBR Green expresada como la media \log_{10} del número de copias de ADN del PCV2 / ml de ADN total en la muestra de cerdas de reemplazo hasta el primer parto examinadas.

GRANJA	A	B	C	D
Ingreso				
suero	5.3 (3/10)*□	6.0 (3/10)□	5.4 (6/10)□ □	5.4 (1/10)□
hisopo nasal	6.5 (9/10)□	6.1 (9/10)□	5.4 (5/10)□	4.5 (2/10)□
hisopo vaginal	6.6 (9/10)□	6.2 (10/10)□	4.1 (5/10)□	4.7 (3/10)□
Aclimatización				
suero	5.0 (5/10)□	5.9 (6/10)□	5.7 (3/10)□	0 (0/10)
hisopo nasal	6.8 (9/10)□	NR	5.2 (9/10)□	6.0 (2/10)□
hisopo vaginal	6.6 (3/10)□	NR	5.5 (7/10)□	5.2 (3/10)□
Parto				
suero	5.0 (6/10)□	5.9 (10/10)□	4.4 (5/10)□	5.3 (8/10)□
hisopo nasal	6.1 (6/10)□	5.7 (8/10)□	5.1 (6/10)□	4.8 (4/10)□
hisopo vaginal	4.5 (4/10)□	5.0 (6/10)□	4.7 (8/10)□	4.9 (6/10)□
calostro	0 (0/10)	4.3 (2/10)	4.1 (2/10)	0 (0/10)
Post- parto				
suero	5.8 (6/10)□	5.8 (10/10)□	4.7 (4/10)□ □	5.9 (8/10)□
hisopo nasal	5.6 (6/10)□	5.8 (9/10)□	5.2 (7/10)□	5.2 (5/10)□
hisopo vaginal	4.6 (2/10)□	4.9 (6/10)□	5.2 (7/10)□	5.2 (5/10)□
calostro	0 (0/10)	5.3 (2/10)	5.6 (2/10)	0 (0/10)

*(cerdas positivas / total examinadas), NR= no realizado

Valores de carga viral con letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0.05$)

4.2.7 Carga viral en lechones neonatos

Los resultados de la carga viral en el suero precalostral, hisopos nasales y tejidos de los lechones nacidos vivos se presentan en la Tabla 4. En el 48,8% de los lechones examinados se detectó ADN viral en suero precalostral. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la carga viral presente en el suero al comparar los hallazgos de las cuatro granjas, pero en las granjas A y B se registró un mayor número de lechones virémicos. Se destaca que en la granja A, la carga viral en los tejidos de los lechones neonatos fue menor a la

detectada en el resto de las granjas.

Tabla 4.Carga viral obtenida por la prueba PCR SYBR Green expresada como la media log10 del número de copias de ADN del PCV2 / ml o mg de ADN total en la muestra de los lechones nacidos vivos examinados.

GRANJA	A	B	C	D
Parto				
suero	5.1 (30/40)* ^a	5.8 (40/40) ^a	5.8 (4/40) ^a	5.6 (4/40) ^a
hisopo nasal	6.0 (1/40)	4.8 (8/40) ^a	5.2 (26/40) ^a	4.2 (19/40) ^a
pool tejidos	2.2 (17/20) ^b	8.1 (1/20)	6.2 (3/20)	4.1(1/20)

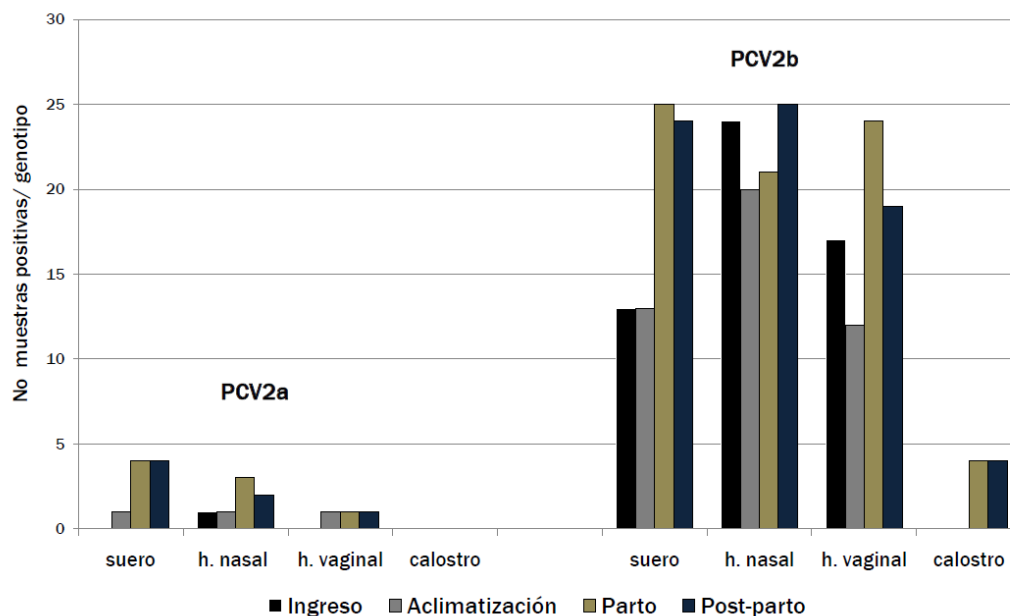
*(lechones positivos / total evaluados)
Valores de carga viral con letras distintas difieren estadísticamente (p<0.05)

4.2.8 Clasificación genotípica de las muestras ADN PCV2 positivas

Tanto en las cerdas como en los lechones neonatos, la mayoría de las muestras con resultado positivo por la prueba PCR SYBR Green fueron clasificadas dentro del genotipo PCV2b de acuerdo con los valores Tm del producto amplificado. En las cerdas, el genotipo PCV2b se detectó en el 92.8% de las muestras positivas, distribuidas así: 89.3% de las muestras de suero, el 92.8% de las muestras de hisopos nasales, el 96% de los hisopos vaginales y 100% de las muestras de calostro. Mientras que el genotipo PCV2a fue detectado en el 10.7% de las muestras de suero, en el 7.2% de los hisopos nasales y el 4% de los hisopos vaginales. En todos los tipos de muestras analizadas, el PCV2b fue el genotipo predominante independientemente de la fase evaluada (Figura 5).

Igualmente, se detectó infección *in útero* por el PCV2b en el 92.3% de las muestras colectadas en lechones neonatos, registrándose en el 92.2% de las muestras positivas de suero precalostrál, en el 85.2% de los hisopos nasales y en el 100% de las muestras de tejidos fetales PCV2 positivos.

Figura 5. Número de muestras positivas por genotipo del PCV2 en las cerdas de acuerdo con los valores Tm del producto de la PCR SYBR Green en cada fase.



4.3 Discusión

En el presente estudio se normalizó la técnica SYBR Green para la detección del ADN del PCV2 en diferentes tipos de muestras de campo. En la literatura se encuentran diferentes protocolos de PCR para la detección del PCV2 entre los cuales se han descrito: PCR convencional (Cheung et al., 2007), PCR anidada (Lyoo et al., 2008), polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción-PCR-RFLP (Wen et al., 2005), sondas Taqman (Trible et al., 2012) y la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP (Qiu et al., 2012). Por otro lado, la caracterización y diferenciación de los genotipos PCV2b y PCV2a se ha realizado principalmente por análisis de las secuencias de nucleótidos (Li et al., 2010) y la técnica cuantitativa SYBR Green ha sido normalizada para la detección del PCV2 (McIntosh et al., 2009).

Teniendo en cuenta la alta identidad genética entre los virus PCV2a y PCV2b (>95%) (Olvera et al., 2007), el diseño de cebadores con alta sensibilidad y especificidad para diferenciar entre genotipos debe ser muy cuidadoso. Los dos genotipos pueden ser diferenciados con base en una secuencia característica en el ORF2, los virus PCV2b contiene la secuencia de TCA / AAC / CCC / CG en la posición 1486-1472 del genoma viral mientras que los aislados PCV2a tiene la secuencia del CAC / AAC / AAA / AT en la posición 1487-1473 (Cheung et al., 2007). En este trabajo, los cebadores utilizados amplifican una región de 118 pb del gen de la cápside correspondiente a un segmento ubicado entre las posiciones 1417 - 1534 dentro de la cual se encuentra el motivo de diferenciación. Por tanto, la prueba SYBR green implementada pudo detectar y diferenciar cepas de los genotipos PCV2a y PCV2b.

Por otro lado, los amplicones de los productos de la PCR de ambos genotipos presentan una diferencia en la curva de disociación (T_m) de aproximadamente 1.92°C lo cual permitió diferenciar a través de los valores T_m los genotipos PCV2a y PCV2b. Por lo general, se aceptan variaciones de 2°C para la diferenciación de productos en la prueba SYBR Green (Ririe et al., 1997) los cuales son suficientes para diferenciar especies e inclusive puede detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Huygens et al., 2006). Por otro lado, variaciones menores de 1°C han sido descritas para distinguir entre genotipos de otros agentes como *Borrelia garinii* y *Cryptosporidium parvum* (Pietila et al., 2000; Tanriverdi et al., 2002).

Con relación a otros métodos moleculares, la técnica SYBR Green implementada en este estudio presentó algunas ventajas como la posibilidad de detección y diferenciación simultáneamente los dos principales genotipos del PCV2, es de fácil realización y es más económico que otros protocolos como las sondas marcadas. No obstante, se debe tener en cuenta que el colorante SYBR Green puede intercalarse entre doble cadenas de ADN, por tanto el procedimiento debe

incorporar controles positivos y negativos dentro de cada corrida de la prueba y el valor Tm del producto debe analizarse individualmente para cada muestra con el fin de descartar cualquier tipo de contaminación.

Los resultados de la prueba SYBR Green obtenidos en la evaluación de las cerdas de remplazo desde su ingreso hasta su primer parto permitieron demostrar la introducción de cerdas aparentemente sanas pero infectadas con el PCV2, sin embargo, los porcentajes de animales positivos al ingreso sugiere una posible asociación entre el nivel de infección y la edad de introducción de la cerda a los corrales o unidades de aclimatización de las granjas. También se pudo registrar la presencia de cerdas virémicas y la eliminación viral a través de los exudados nasales y vaginales, durante el periodo analizado lo cual facilitaría la difusión horizontal del PCV2 entre cerdas infectadas y susceptibles. Sería necesario por consiguiente, investigar los factores ambientales y de manejo que pueden afectar la carga viral y la expresión clínica del PCV2 en las cerdas de reemplazo.

En Colombia, la mayoría de las explotaciones porcinas son seropositivas al PCV2 pero solo en algunas se ha presentado brotes o casos individuales del Síndrome Multisistémico de Emaciación Post-destete (PMWS) (Clavijo et al., 2008). Un estudio realizado en España permitió establecer que las infecciones tempranas, por el PCV2 pueden causar infección sistémica cuando los anticuerpos maternos descienden y luego a medida que se incrementa los títulos de AN desciende la viremia en los lechones (Fort et al., 2007). En las granjas estudiadas, del 10% - 60% de las cerdas analizadas presentaban viremia en el momento de ingresar a la granja es decir tuvieron contacto con el PCV2 en la granja de origen y luego en la granja de cría pudieron estar expuestas al virus por contacto directo con otras cerdas infectadas, esto podría explicar la alta viremia en un porcentaje significativo de animales en el momento del parto.

De forma típica, las fallas reproductivas asociadas a la infección por el PCV2 son reportadas en granjas donde se cambia la fuente de hembras, en

explotaciones recién pobladas, con alto porcentaje de cerdas de reemplazo o en poblaciones seronegativas (Josephson & Charbonneau, 2001; O'Connor et al., 2001; Pittman, 2008; West et al., 1999). Pero también se ha reportado problemas reproductivos en explotaciones seropositivas, en cerdas de diferentes partos y han sido reproducidos experimentalmente en cerdas seropositivas al PCV2 (Janke, 2000; Nielsen et al., 2004).

En algunos estudios de infección experimental o de campo, la infección de las cerdas jóvenes por el PCV2 ocasionó fallas reproductivas, signos clínicos en las cerdas y aumento en el número de lechones no viables (O'Connor et al., 2001, Park et al., 2005, Pittman et al., 2008, West et al., 1999), pero bajo las condiciones de este estudio, no se observaron manifestaciones clínicas de tipo reproductivo asociadas a la infección por el PCV2 en las cerdas de reemplazo analizadas. Las divergencias en los resultados podrían explicarse por diferencias en la virulencia de las cepas circulantes en las granjas, en las condiciones de manejo o la susceptibilidad de los animales. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la infección por PCV2 de las primerizas puede ocasionar infección subclínica de los neonatos y no necesariamente brotes de enfermedad reproductiva.

Con relativa frecuencia, las cerdas preñadas infectadas por el PCV2 muestran signos clínicos de infección, son seropositivas y están viremicas al momento del parto. Por lo tanto, el diagnóstico de infección fetal basado en el diagnóstico de infección en la cerda se debe evitar para eludir posibles confusiones en la interpretación de los resultados (Madson and Opriessnig, 2011). Para diagnosticar los problemas reproductivos asociados al PCV2 se debe tener en cuenta los siguientes criterios: aumento en el número de abortos y / o mortinatos, en los fetos momificados, junto con lesiones de miocarditis no supurativa, fibrosis o necrosis en el miocardio y la detección del PCV2 asociado a las lesiones histopatológicas en tejidos fetales (Segalés et al., 2006).

En el presente estudio se pudo demostrar que la infección de las cerdas primerizas originó la infección y el desarrollo de AN en los lechones neonatos aparentemente sanos confirmando el mecanismo de transmisión vertical del PCV2. La infección materna es probablemente la principal fuente de infección fetal teniendo en cuenta que la viremia por el PCV2 en las cerdas puede durar varias semanas (Park et al., 2005; Pensaert, et al., 2004). Otra fuente de infección del PCV2 es la inseminación de cerdas sanas con semen contaminado (Larochelle et al., 2000; McIntosh et al., 2006; Schmoll, 2008; Sarli et al, 2012). También se ha demostrado la transmisión del PCV2 feto a feto (Yoon et al., 2004).

Recientes estudios han revelado que la infección *in útero* por el PCV2, es un fenómeno común en granjas positivas al PCV2. Shen et al. (2010), evaluaron las cerdas de cría en cinco explotaciones ubicadas en Estados Unidos y México, en las cuales no se registraba casos de PMWS y solo en una de estas se vacunaba las cerdas de reemplazo antes de entrar a la cría. El 96,8% de los sueros y el 100% de las muestras de calostro mostraron resultados positivos en la detección de anticuerpos anti-PCV2 IgG a través de una técnica inmunoenzimática (ELISA). La carga de ADN para el PCV2 fue del 47,2% (59/125) en el suero de las cerdas, del 40,8% (51/125) en calostro y del 39,9% (199/499) en el suero precalostrado. La prevalencia de la infección *in útero* a nivel de granja osciló entre el 17% y el 71% (Shen et al., 2010).

Como se puede deducir, dependiendo del momento de la infección, la viremia de la cerda en gestación puede resultar en la infección *in útero* de todos o algunos fetos de la camada, en el nacimiento de lechones con infección activa o el nacimiento de lechones aparentemente sanos. En el presente estudio se debe destacar la detección de lechones neonatos sanos con cargas virales entre 5.10 a 5.80 (# copias de ADN log10/ml de suero) y títulos de AN ($\leq 1:32$), lo cual sugiere estados de infección persistente durante la vida fetal. La detección del ADN viral hasta 125 días después de la infección fue reportada en un estudio

experimental realizado en lechones infectados *in útero* obtenidos por cesárea y privados de calostro (Bolin et al., 2001).

Los fetos pueden eliminar la infección por el PCV2 si la infección primaria ocurre en la etapa de inmunocompetencia fetal (Madson et al., 2009) pero la viremia y la detección del virus en los tejidos de los neonatos con AN, sugiere que la inmunidad humoral no sería el único mecanismo para la eliminación de la infección.

De otro lado, la transmisión vertical del PCV2 no solo se ha relacionado con fallas reproductivas sino con el desarrollo de infecciones asociadas al PCV2 en la vida post-natal. Todos los lechones vivos obtenidos de cerdas gestantes experimentalmente infectadas con el PCV2 tres semanas antes del parto desarrollaron signos de clínicos asociados al PCV2 luego de ser desafiados a los 63 días de edad con el Parvovirus porcino o inmunoestimulados con hemocianina en adyuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA).

En el presente trabajo, se registró un bajo número de muestras de calostro ADN PCV2 positivas, estos hallazgos coinciden con los datos reportados por Shibata et al. (2006), quienes detectaron ADN viral solo en una de las 133 muestras de calostro colectadas en tres granjas de ciclo completo. De igual manera, en un estudio de infección experimental realizado en cerdas gestantes infectadas por la vía intranasal, se logró aislar el PCV2 solamente en dos de las seis muestras de calostro examinadas (Ha et al., 2009). Pero en otro estudio realizado con cerdas naturalmente infectadas se logró el aislamiento del PCV2 en 22 de 41 muestras de calostro, siete de las cuales habían sido colectadas de cerdas vacunadas frente al PCV2 y 15 de 21 hembras no inmunizadas (Gerber et al. 2011). Las diferencias entre los estudios puede relacionarse con diferencias en los protocolos de infección, la virulencia de las cepas PCV2 utilizadas, los niveles de anticuerpos de las cerdas y la sensibilidad de las pruebas utilizadas. A pesar de

las diferencias entre los estudios, es factible inferir que la excreción de PCV2 a través del calostro puede ocurrir con cierta frecuencia dependiendo del estatus de infección de la cerda al momento del parto y las condiciones de manejo de las cerdas en las granjas.

En el estudio de Gerber et al., 2011, el porcentaje de detección del PCV2 fue mayor en calostro comparado con la leche, una explicación a este fenómeno es la presencia de un mayor número de células monocíticas en el calostro comparado con la leche, las cuales son muy susceptibles a ser infectadas con el PCV2. La leche contiene predominantemente células epiteliales glandulares, consideradas menos propensas a la infección por el PCV2. Sin embargo, el virus puede estar presente en la leche y el calostro de las cerdas infectadas de forma natural, incluso en presencia de anticuerpos anti-PCV2 (Park et al., 2009).

Las inmunoglobulinas tipo A (IgA) frente al PCV2 secretadas en el calostro y la leche pueden jugar un papel importante en la protección contra la infección temprana del lechón a través del tracto gastrointestinal en los lechones lactantes. Un estudio demostró que el PCV2 se replica en las células epiteliales del tracto gastrointestinal de los cerdos infectados naturalmente (Perez-Martin et al., 2007) y la respuesta local de IgA (no IgG o IgM), es importante para controlar la replicación del virus durante la infección temprana (Yu et al., 2007). El efecto de la eliminación del PCV2 a través del calostro y la leche sobre la infección de los lechones amerita la realización de trabajos investigación teniendo que la infección temprana de los lechones podría tener un efecto significativo sobre la mortalidad de las camadas en las granjas afectadas por el PMWS (Calsamiglia et al., 2007).

La evaluación serológica de las cerdas, mostró que todos los animales presentaban anticuerpos neutralizantes en las diferentes fases evaluadas con variaciones individuales en los títulos VN. Debido a la naturaleza ubicua del PCV2, es de esperar que la mayoría de las cerdas de reemplazo y las cerdas multíparas estén expuestas al virus en alguna etapa de su vida y por tanto

desarrollen una respuesta humoral. En un trabajo de investigación realizado en seis piaras de cría de Estados Unidos, se evaluaron serológicamente todas las cerdas para determinar la presencia de anticuerpos frente al PCV2. Del 50% al 80% de las hembras dieron resultados positivos por la técnica de ELISA utilizada y no se encontraron diferencias en los valores s/p de la prueba entre las cerdas de alta y baja paridad (Opriessnig et al., 2004). En otro estudio, realizado en seis granjas comerciales ubicadas en Minnesota, Iowa e Indiana se encontró que las cerdas de diferentes paridades estaban infectadas con el PCV2 al parto en presencia de niveles sustanciales de anticuerpos anti-PCV2, incluso en granjas de alta salud con sistema de filtración de aire (Dvorak et al., 2013).

Algunos estudios sugieren que la exposición del feto al PCV2 ocurre principalmente después del episodio de viremia materna, por tanto, los niveles de anticuerpos maternos parecen reducir la cantidad de virus que puede atravesar la placenta (Park et al, 2005; Madson et al, 2009b). Teniendo en cuenta que la exposición al virus no causa infección de toda la camada y la transmisión usualmente ocurre entre fetos adyacentes (Sánchez et al., 2001, Pensaert et al., 2004, Saha et al., 2010, Yoon et al., 2004), los anticuerpos maternos parecen brindar una protección parcial contra la infección *in útero* de los lechones (Madson et al, 2009c;.. Madson et al, 2011a). Así mismo, la diseminación del virus a los tejidos linfoides y la subsecuente viremia parece estar favorecida por bajos títulos de anticuerpos maternos (Madson et al, 2009b).

En ninguna de las granjas examinadas se reportó problemas reproductivos en las cerdas estudiadas pero el análisis de los valores Tm de la prueba SYBR Green permitieron demostrar que los genotipos PCV2a y PCV2b estaban asociados con infección *in útero* en cerdas gestantes infectadas lo cual es consistente con los reportes experimentales y de campo previamente publicados. En Brasil, se evaluaron tejidos obtenidos de 168 fetos abortados o momificados colectados en cinco granjas de ciclo completo con historia de circovirosis porcina ubicadas en el

estado de São Paulo. Mediante una técnica PCR convencional se detectaron 18 muestras positivas (10,7%) de las cuales, 10 cepas se clasificaron como PCV2b y una como PCV2a. Sin embargo, no se encontraron motivos repetitivos en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside seleccionada para la secuenciación que pudiera ser asociado con la inducción de fallas reproductivas (Castro, et al., 2012).

En otro estudio experimental, se infectaron *in utero* fetos de 55 días de gestación con cepas de PCV2 obtenidas de fallas reproductivas (PCV2a), del síndrome dermatitis nefropatía porcina (PCV2b) y de cerdos afectados con PMWS (un aislado PCV2a y otro PCV2b). A los 21 días post-inoculación, se observó lesiones macroscópicas y alta carga viral en tejidos con todos los aislados de PCV2 utilizados en el estudio experimental (Lefebvre et al., 2008). De acuerdo con la información científica disponible hasta la fecha, las diferencias genotípicas entre las cepas de PCV2 no parecen estar relacionadas con las manifestaciones reproductivas del PCV2.

4.4 Conclusiones

- En este estudio se demostró la introducción de cerdas de remplazo con infección ubclínica por el PCV2 a granjas de cría comerciales y multiplicadoras.
- Se encontró relación entre edad de ingreso de las cerdas de reemplazo a las granjas y el número de animales virémicos y eliminadores del PCV2.
- Se registró la presencia de cerdas virémicas y la eliminación del PCV2 a través de los fluidos nasales y vaginales, durante las etapas de aclimatización, parto y post-parto lo cual favorece la difusión horizontal del PCV2 entre cerdas infectadas y susceptibles.

- La infección subclínica por PCV2 en las cerdas las primerizas puede ocasionar infección subclínica en su progenie y no necesariamente brotes de enfermedad reproductiva.
- Se registró el nacimiento de lechones sanos con cargas virales moderadas o altas en el suero y tejidos, en presencia de anticuerpos neutralizantes, lo cual sugiere estados de infección persistente durante la etapa fetal.
- El calostro, las secreciones nasales y vaginales de las cerdas infectadas por el PCV2 al parto pueden ser fuente de infección para los lechones neonatos.
- Se observó un mayor predominio del genotipo PCV2b en la infección subclínica de las cerdas de reemplazo y en la infección *in utero* de los lechones.
- La técnica SYBR Green implementada en este estudio permitió detectar y diferenciar simultáneamente los genotipos del PCV2a/b lo cual es útil para estudios epidemiológicos relacionados con la enfermedad.

4.5 Recomendaciones

La inmunidad de las cerdas de reemplazo frente al PCV2 es un factor a considerar dentro de los procesos de aclimatación durante la cuarentena teniendo en cuenta que el estatus de infección y la inmunidad de las cerdas puede incidir en la infección de los lechones.

Disminuir los factores ambientales y de manejo de las cerdas de reemplazo que pueden afectar la carga viral y la manifestación reproductiva por el PCV2.

La infección de las cerdas por el PCV2 es un factor a considerar dentro del

diagnóstico diferencial de los problemas reproductivos en porcinos.

Evitar el diagnóstico de infección fetal por PCV2 basado en el diagnóstico de infección en la cerda debido a la coexistencia de anticuerpos y virus en las madres.

Referencias

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

Brunborg, I.M., Jonassen, C.M., Moldal, T., Bratberg B, Lium B, Koenen F, Schönheit J., 2007. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J Vet Diagn Invest* 19, 368–375.

Calsamiglia, M., Fraile, L., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Mateu, E., Segales, J., 2007. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci* 82, 299–304

Castro, A.M.M.G., Cruz, T. F., Salgado, V. R., Kanashiro, T.M., Ferrari K.L., Araujo, J.P., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2012. Detection of porcine circovirus genotypes 2a and 2b in aborted foetuses from infected swine herds in the State of São Paulo, Brazil. *Acta Vet Scand* 54, 29

Clavijo, J., Rincón, M.A., Mogollón, G. J.D., 2008. Pathological findings on porcine circovirus type 2 associated diseases in Colombia. *Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa*, p 550.

Chae, C., 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet. J.* 169 (3), 326–336.

Cheung, A.K., Lager, K.M., Kohutyuk, O.I., Vincent, A.L., Henry, S.C., Baker, R. B., Rowland, R.R., Dunham, A.G., 2007. Detection of two porcine circovirus type 2

genotypic groups in United States swine herds. Arch Virol, 152, 1035–1044.

Dvorak C.M, Lilla, M.P., Baker, S.R, Murtaugh, M.P., 2013. Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. Vet Microbiol. 166(3-4), 365-74

Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. Vet. Microbiol. 125, 244–255.

Ha, Y., Ahn, K.K., Kim, B., Cho, K.D., Lee, B.H., Oh, Y.S., Kim, S.H., Chae, C., 2009. Evidence of shedding of porcine circovirus 2 in milk from experimentally infected sows. Res Vet Sci 86, 108–110

Gerber, P.F, Garrocho, F.M., Lana, A.M., Lobato, Z.I., 2011. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. Vet J. 188(2), 240-242.

Huygens, F., Inman-Bamber, J., Nimmo, G.R., Munckhof, W., Schooneveldt, J., Harrison, B., McMahon, J.A., Giffard, P.M., 2006. *Staphylococcus aureus* genotyping using novel real-time PCR formats. J Clin Microbiol 44, 3712–3719.

Janke, B.H., 2000, Case report: Porcine circovirus as a cause of reproductive problems. Proc. Vet. Med. Ass. Ames, Iowa 118, 101

Josephson, G., Charbonneau, G., 2001, Case report of reproductive problem in a new startup operation. Swine Health and Production 9, 258–259

Larochelle, R., Bielanski, A., Muller P., Magar, R., 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. J. Clin. Microbiol. 38, 4629–4632.

Lefebvre, D., Barbé, F., Atanasova, K., Nauwynck, H., 2008, Inoculation of porcine foetuses with different genotypes and doses of PCV2. Proc 20th International Pig Veterinary Society Congress 1, 38.

Li, W., Wang, X., Ma, T., Feng, Z., Li, Y., Jiang, P., 2010. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. Virus Genes 40, 244–251

Lyoo, K.S., Kim, H.B., Joo, H.S., 2008. Evaluation of a nested polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of Porcine circovirus-2. J Vet Diagn Invest 20, 283–288.

Madson, D.M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2009. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of the dam on PCV2 replication in utero. Clin. Vac. Immunol 16(6), 830–834

Madson, D.M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2009. Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen. Theriogenol 72, 747–754.

Madson, D.M., Opriessnig, T., 2011. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. Anim Health Res Rev 12, 47–65.

Madson, D.M., Opriessnig, T., 2011. PCV2-associated reproductive failure. American Association of Swine Veterinarians .Annual Meeting 427-432

Madson, D.M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J., Opriessnig T., 2009. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 46, 707–716.

Mateusen, B., Maes, D.G., Van, Soom A., Lefebvre, D., Nauwynck, H.J., 2007. Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenol* 68, 896–901.

Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Botner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet. Res* 30;2:6

McIntosh, K.A., Tumber, A., Harding, J.C.S., Krakowka, S., Ellis, J.A., Hill, J.E., 2009. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Vet Microbiol* 133, 23–33

McIntosh, K. A., Harding, J. C., Parker, S., Ellis, J. A. , Appleyard, G. D., 2006. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *J. Vet. Diagn. Investig* 18, 380–384.

Nielsen, J., Ladekjær-Hansen, A.S., Bille-Hansen, V., et al., 2004, PCV2-associated disease following intrauterine infection. *Proc 18th International Pig Veterinary Society Congress* 1, 14-

Park, J.S., Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Lim, J.K , Kim, S.H. , Chae, C., 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J. Comp. Pathol* 132, 139–144.

Pensaert, M. B., Sanchez, R. E. Jr., Ladekjær-Mikkelsen, A. S., . Allan, G. M., Nauwynck, H. J., 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet. Microbiol* 98, 175–183.

O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E.G., Konoby, C., Allan, G., Ellis, J.A., 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can. Vet. J.* 42, 551–553.

Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175–185.

Opriessnig, T., Yu, S., Thacker, E. L., Halbur, P. G., 2004. Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *J. Swine Health Prod.* 12, 186–191.

Park, J.S., Ha, Y., Kwon, B., Cho, K.D., Lee, B.H., Chae, C., 2009. Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. *J Comp Pathol* 140, 208–211.

Peréz-Martín, E., Rovira, A., Calsamiglia, M., Mankertz, A., Rodríguez, F., Segalés, J., 2007. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *J. Virol. Methods* 146, 86–95.

Pejsak, Z., Podgorska, K., Truszczynski, M., Karbowiak, P., Stadejek T. 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33(6): 1–5.

Pescador, C.A., Bandarra, P.M., Castro, L.A., Antoniassi, N.A.B., Ravazzolo, A.P., Sonne, L., Cruz, C.E.F., Driemeier, D., 2007. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. *Pesqui Vet Bras.* 27, 425–429.

Pittman, J. S., 2008. Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. *J. Swine Health Prod.* 16, 144–148.

Pietila, J., He, Q., Oksi, J., Viljanen, M.K., 2000. Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi sensu stricto* by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the *recA* gene. *J Clin Microbiol* 38, 2756–2759.

Qiu, X., Li, T., Zhang, G., Cao, J., Jin, Y., Xing, G., Liao, M., Zhou, J., 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification method to rapidly detect porcine circovirus genotypes 2a and 2b. *Virol J.* 9, 318

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154–160.

Saha, D., Lefebvre, D.J., Van Doorselaere, J., Atanasova, K., Barbé, F., Geldhof, M., Karniyuchuk, U.U., Nauwynck, H.J., 2010. Pathologic and virologic findings in midgestational porcine after experimental inoculation with PCV2a or PCV2b. *Vet Microbiol* 145, 62–68.

Sanchez, R.E., Nauwynck, H.J., McNeilly, F., Allan, G.M., Pensaert, M.B., 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet Microbiol* 83, 169–176.

Sarli, G., Morandi, F., Panarese, S., Bacci, B., Ferrara, D., Bianco, C., Fusaro, L., Bacci, ML, Galeati G, Dottori M, Bonilauri P, Lelli D, Leotti G, Vila T, Joisel F, Allan G, Benazzi, C., Ostanello, F., 2012.Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts inseminated with PCV2 spiked semen. *Acta Vet Scand.* 31, 54:51

Segales, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2006. Porcine circovirus diseases. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D’Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 299–307.

Shen, H., Wang, C., Madson, D.M., Opriessnig, T., 2010. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Prev Vet Med* 97, 228–236.

Shibata, J., Okuda, Y., Kitajima, K., Asai, T., 2006. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *J. Veterinary Medicine Series B* 53, 278–280.

Schmoll, F., 2008. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenol* 69, 814–821.

Tanriverdi, S., Tanyeli, A., Baslamisli, F., Koksali, F., Kilinc, Y., Feng, X., Batzer, G., Tzipori, S., Widmer, G., 2002. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 40, 3237–3244.

Tribble, B.R., Rowland, R.R., 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res* 164, 68–77.

Togashi K., Mawatari T., Mitobe S., Moriya, S., 2011. Reproductive Losses Associated with Porcine Circovirus Type 2 in a Japanese Herd of Seronegative

Sows. *J. Vet. Med. Sci.* 73(7), 941–944

Wen, L., Guo, X., Yang, H., 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet Microbiol* 110, 141–146.

West, K. H., J. M. Bystrom, C. Wojnarowicz, N. Shantz, M. Jacobson, G. M. Allan, D. M. Haines, E. G. Clark, S. Krakowka, F. McNeilly, C. Konoby, K. Martin, and J. A. Ellis., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Investig* 11, 530–532.

Yoon, K.J., Jepsen, R.J., Pogranichniy, R.M., Sorden, S., Stammer, R., Evans, L.E., 2004. A novel approach to intrauterine virus inoculation of swine using PCV type 2 as a model. *Theriogenol* 61, 1025–1037.

Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 261–272.

Anexo 1. Técnica de seroneutralización para la detección de anticuerpos frente al circovirus porcino tipo 2

Objetivo

El objetivo de este protocolo es describir la técnica de seroneutralización para el Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) utilizando células PK-15.

Reactivos y materiales

Frasco de 25 cc, con células PK15 de 24 horas

Medio MEM + Antibiótico 1% frío

Medio MEM + Antibiótico 1% + L-glutamina 1% + Suero Fetal Bovino 5% (37°C)

PBS

Tripsina 1X EDTA

Microplaca de 96 pozos

Canoas de dilución

Puntas estériles de 1000 y 100 µl

Vortex

Tubos eppendorf de 15 y 50 ml

Multicanal, Pipetas de 1000 y 200 µl

Hielo, gradillas

Procedimiento

1. Dispense 50µl de Medio (MEM + Antibiótico 1% + L-glutamina 1% + SFB 5%) en todos los pozos de la microplaca
2. Adicione 50 µl del suero problema No. 1 (inactivado a 56°C por 30 minutos) en los pozos A1 y B1. Mezclar con cuidado. Dilución 1:2
3. Dispense 50 µl del suero problema # 2 en los pozos C1 y D1
4. Dispense 50 µl del suero problema # 3 en los pozos E1 y F1
5. Adicione 50µ del suero control positivo en el pozoG1
6. Adicione 50µ del suero control negativo en el pozoH1
7. Utilizando una multicanal, transfiera 50 µl de la columna 1 a la columna 2 y

realice diluciones seriadas hasta la columna 12 (Dilución 1:4096). Mezclar 6 veces en cada pozo. Eliminelos últimos 50 µl. (Ver figura 1).

Figura 1.

Titulo	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G +												
H -												

8. Diluya el inoculo del virus PCV2 stock previamente titulado, hasta obtener una concentración final de 200TCID₅₀/pozo.

Ejemplo:

Titulo del stock 10^{6.3} TCID₅₀/ml

$$6.4 - (\log_{200} + 1.3)$$

$$6.4 - (2.3 + 1.3)$$

$$6.4 - (3.6)$$

$$2.8 \quad \text{AntiLog } 0.8 = 6.3 \quad (\text{Factor de dilución})$$

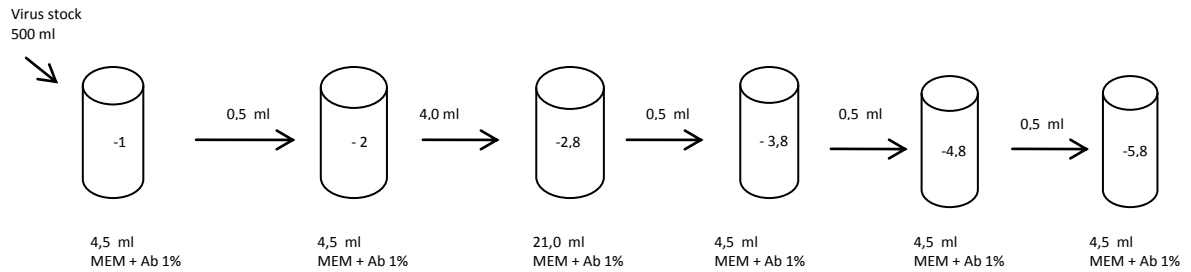
Nota: Log₂₀₀ = 2.3

$$1.3 = \log_{20}(\text{para } 50 \mu\text{l utilizados en la prueba})$$

Factor de dilución: 5 → ----- 6.3

X ----- 25 ml (para 5 placas)

$$X = 3,964 \text{ ml de } 10^{-2} + 21,0 \text{ MEM} + \text{Ab1\% frío}$$



9. Adicione 50 μ l de la suspensión con 200 TCID₅₀/pozo en todos los orificios de las microplacas. Incube a 37°, 5% CO₂ x 1 hora.

10. Lave con PBS y trate con tripsina el cultivo fresco de células PK.15. Centrifuge con medio MEM suplementado durante 7 minutos y resuspenda en 1 ml de medio MEM suplementado.

Prepare una suspensión de células conteniendo 120.000 células /ml

Ejemplo:

Conteo promedio de células: 250

Dilución 1:3 = 10 μ l de células + 20 μ l de Azul Tripan

En 1 ml de Medio

$250 \times 10.000 \times 3 \times 1 = 7.500.000$ células en 1 ml

Para 30 ml $\rightarrow 120.000 \times 30 =$ Se requiere 3.600.000 células

1 ml ----- 7.500.000

X ----- 3. 600.000 X= 0,48 \rightarrow 480 μ l de células + 29,52 ml Medio

11. Prepare la placa control de virus. Dispense 50 μ l de cada dilución de acuerdo con la siguiente figura. Comenzar por mayor dilución para utilizar la misma canoa y puntas.

Ejemplo:

	2.8 (200 TCID ₅₀)		3.8		4.8		5.8				CC	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												

12. Adicione 100 μ l de la suspensión de células en todos los pozos. Dispense 50 μ l de medio suplementado en los pozos de las columnas 11 y 12 (control decélulas). Incube la placa a 37°C, 5% CO₂ por 72 horas.
13. Una vez cumplida la hora de incubación de las microplacas con los suero problemas, adicione 100 μ l (12.000 células /pozo) de la suspensión anterior de células en todos los pozos de las microplacas. Incube a 37°, 5% CO₂ x 72 horas
14. Para revelar la prueba realizar la técnica de IPMA (Anexo 2)

Validacion de la prueba:

Ejemplo:

2.8 (200 TCID ₅₀)		3.8		4.8		5.8				C C	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
+	+	+	+	+	+	-	-			-	-
+	+	+	+	+	+	-	-			-	-
+	+	+	+	+	-	-	-			-	-
+	+	+	+	+	-	-	-			-	-

+ = Células con marcación

- = Células no marcadas

2.8 3.8 4.8 5.8
 8 pozos+ 8+ 6+ 0+
 Log ----- 8 pozos
 X ----- 6 pozos \longrightarrow $6/8 = 0.75$

$3.8 + 0.75 + (0.5 + 1.3) = 6.35$

$6.35 - 2.8 = 3.55 \longrightarrow$ Anti Log de 3.55 = 3.548

Para validar la prueba este valor debe dar entre 1000 (10^3) a 10.000 (10^4)

Anexo 2. Técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) para la detección del circovirus porcino tipo 2

Objetivo

Descripción de la técnica de Inmunoperoxidasa en Monocapa (IPMA) para la detección del PCV2 en cultivos celulares

Materiales

PBS: Para 1 litro: NaCl	8,0 gr
KCl	0,2 gr
Na ₂ HPO ₄	1,15 gr
KH ₂ PO ₄	0,2 gr

Proteína A (SIGMA P8651- 1 mg)

Solución de Revelado (AEC DAKO Cytomation K3469 x 110 ml)

Acetona (J.T. Baker Cat. 9006-03, México)

Peroxido de hidrógeno 30% (Carlo Erba Cat. 7722-84-1, Francia)

Albúmina Sérica Bovina (ASBSigma A 7030-50G, USA)

Metanol absoluto(J.T. Baker Cat. 9070-02, México)

Tween 20 (Sigma-Aldrich Cat. P1379, USA)

Agua destilada

Suero de campo hiperinmune porcino para PCV2 (titulo seroneutralizante \geq 1:4,096)

Multicanal

Micropipeta

Puntas no estériles de 200 μ l y 1000 μ l

Pipetas de 20 ml

Canoas

Tubos falcon de 50 ml

Incubadora a 37°C

Congelador -20°C, Microscopio óptico

Procedimiento

1. Las células a teñir bajo este procedimiento se deben lavar una vez con 200 μ l de PBS
2. Fijar las células con una solución de metanol- acetona en proporción 50:50 fría. Dispensar 50 μ l en cada pozo de una microplaca de 96 orificios y llevar al congelador -20°C durante un mínimo de 20 minutos.
3. Eliminar el fijador y dejar evaporar. Si no se colorea la microplaca el mismo día, forrarla en papel aluminio y conservar a 4°C.
4. Para inhibir la peroxidasa endógena, dispensar 50 μ l de metanol con peróxido de hidrógeno al 1%.
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar tres veces la microplaca con 200 μ l /pozo de PBS + Tween 1% + ASB 1%
7. Preparar el anticuerpo primario en dilución 1: 200 en PBS-Tween 1%-ASB 1%.Dispensar 50 μ l por pozo.
8. Incubar 1 hora a 37°C en cámara húmeda
9. Lavar tres veces la microplaca con 200 μ l /pozo de PBS + Tween 1% + ASB 1%
10. Preparar la Proteína A en una concentración final de 0,67 μ g/ml en PBS + Tween 1% + ASB 1% (Dilución 1/750) y dispensar 50 μ l /pozo
11. Incubar 1 hora a 37°C en cámara húmeda
12. Lavar 3 veces la microplaca con 200 μ l /pozo de PBS+Tween 1%+ ASB 1%
13. Adicionar en cada pozo una gota (50 μ l) del revelador AEC
14. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
15. Lavar tres veces con agua destilada
16. Eliminar el agua por inversión y leer en microscopio óptico (Objetivo 40X)

Anexo 3. Procedimiento para la prueba PCR tiempo real SYBR GREEN para la deteccion del PCV2

Objetivo

Descripción de una técnica PCR tiempo real SYBR GREEN para la la detección del PCV2 en muestras de fluidos y tejidos

1. Cebadores:

Nombre	Secuencias 5'- 3'	Número acceso	Posición genoma	Longitud del amplicon (bp)
ABF 5'	CCAGAATTCAACCTTMACYTTYC	AY579893	1416 - 1439	118
ABR 5'	GCGGTGGACATGMTGAGATT		1515 - 1534	

2. Mezcla de la reacción:

Reactivo	Distribuidor	Concentración final	Cantidad/ muestra (µl)
SYBR Green I Master x 2 conc.	(Roche Cat. 04 887 352 001)		10.0
Agua grado molecular	(Roche Cat. 04 887 352 001)		3.0
ABF 5'	IDT Technologies	1 µM	1.0
ABR 5'	IDT Technologies	1 µM	1.0
ADN			5.0
Volumen final mezcla			20.0

3. Condiciones de la PCR tiempo real SYBR GREEN

Equipo: LightCycler 480 SYBR® Green I Master (Roche Diagnostics)

Programs							
Program Name hot start							
Cycles 1		Analysis Mode	Node				
Target °C	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:01:00	4.40		0	0	0
Program Name pcr							
Cycles 40		Analysis Mode	Quantification				
Target °C	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:01:00	4.40		0	0	0
61	None	00:00:25	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:05	4.40		0	0	0
Program Name meelting							
Cycles 1		Analysis Mode	Melting Curves				
Target °C	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:01:00	4.40		0	0	0
68	None	00:01:00	2.20		0	0	0
90	Continuous		0.11	5	0	0	0
Program Name Cooling							
Cycles 1		Analysis Mode	None				
Target °C	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

5. Comentarios finales

Los hallazgos científicos sobre la historia natural del PCV2 han permitido catalogarlo como uno de los agentes virales estudiados durante los últimos años más sorprendentes. La capacidad del virus para inducir infecciones subclínicas o signos clínicos atribuibles a otros patógenos de los porcinos fue demostrada en el presente estudio mediante la detección del ADN viral en muestras colectadas antes de los brotes severos de PMWS registrados en el país durante los años 2006-2007 así como en las muestras de suero y fluidos de cerdas de reemplazo aparentemente sanas.

A la luz de los resultados obtenidos, es posible deducir la ubicuidad del agente en la población porcina intensiva del país y en forma semejante a lo ocurrido en otras regiones del mundo, la enfermedad ha cambiado haciéndose cada vez menos evidente en los sistemas de producción porcina posiblemente debido a la implementación de medidas de control y la aplicación masiva de la vacuna desde el 2007 especialmente en las regiones donde se concentra la mayor producción porcina del país.

Uno de los vacíos en el conocimiento de la enfermedad a nivel nacional, es el impacto sanitario y económico de la infección por el PCV2 en el sistema de producción porcina de traspato, que representa alrededor del 30% de la población porcina de Colombia. Teniendo en cuenta que los verracos, las cerdas de reemplazo o el semen son adquiridos de granjas tecnificadas por los pequeños productores, se asume que la enfermedad se difundió también a este tipo de explotaciones. La vigilancia epidemiológica pasiva desarrollada por el ICA, dentro

del Proyecto Nacional de Erradicación de la Peste Porcina Clásica ha permitido detectar especialmente en los dos últimos años una alta incidencia de la forma sistémica de circovirus, sin embargo no se ha realizado estudios de prevalencia a nivel de este tipo de explotaciones.

Uno de los limitantes para diagnóstico de la enfermedad en nuestro medio, es la semejanza de los signos clínicos producidos por el PCV2 con otras patologías de los porcinos que causan retraso en el crecimiento y desarrollo de los animales. Igualmente, a medida que se ha incrementado la vacunación es más complicado aplicar los criterios internacionales para el diagnóstico de la enfermedad y muchas veces los productores aceptan la convivencia con la enfermedad siempre y cuando no afecta de forma significativa la rentabilidad y solo se recurre al laboratorio cuando se sospecha de falla vacunal.

La identificación de los factores de riesgo asociados al desarrollo subclínico de la enfermedad en granjas con parámetros reproductivos aceptables y con tasas de mortalidad no tan altas, es un reto a explorar para la industria porcina nacional principalmente en las cerdas de reemplazo donde existe el peligro de introducir una nueva cepa viral y la perpetuación de la infección mediante la transmisión vertical u horizontal del PCV2 a su progenie.

Debido al uso limitado del laboratorio y el poco envío de muestras fetales para el diagnóstico diferencial de las enfermedades reproductivas de los porcinos no se dispone de información sobre la importancia de la transmisión vertical y la infección *in útero* por el PCV2. Se requiere capacitar a los profesionales de campo sobre el tipo de muestras y las pruebas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad reproductiva por el PCV2.

Las vacunas comerciales disponibles hasta el momento fueron elaboradas con el genotipo PCV2a y durante varios años estas mostraron ser eficientes para el control de la enfermedad, sin embargo, recientemente se ha registrado

situaciones de falla vacunal relacionados con la aparición de virus mutantes. Los estudios de epidemiología molecular realizados en diferentes regiones del mundo demuestran la predominancia actual del genotipo PCV2b sobre el PCV2a; por tanto, el efecto de la variación genética sobre la respuesta vacunal y el diagnóstico de la enfermedad debe ser uno de los tópicos a profundizar.

6. Propuesta de estudios futuros

Continuar los estudios aislamiento y epidemiología molecular del PCV2 sobre el genoma completo, para ampliar la información de la enfermedad en el país, conducente a la identificación de nuevas variantes del virus debido a la presión inmune ejercida por la vacuna.

Estudiar el rol de la respuesta inmune celular, humoral e innata en la infección por el PCV2 en las cerdas de cría, para entender porque se presenta viremia, eliminación a través de fluidos y secreción viral en calostro y leche, en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Evaluar los factores de riesgo asociados a la infección clínica y subclínica de las cerdas de reemplazo y el efecto de las medidas de manejo durante la aclimatización en la tasa de infección al parto.

Estudiar las características de las fallas vacunales en los sistemas de producción porcina locales para detectar la aparición de nuevos genotipos o variantes.